

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών:
Βιοτεχνολογία - Ποιότητα διατροφής
και περιβάλλοντος

Διπλωματική Εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΑΛΛΑΞΙΓΟΝΟΥ
ΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΒΟΣΤΡΥΧΩΝ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ
(VITIS VINIFERA).

ΕΛΙΣΑΒΕΤ Γ. ΓΚΑΛΙΤΣΙΟΥ
Βιολόγος



ΛΑΡΙΣΑ 2011

Μελέτη της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου
δράσης εκχυλισμάτων βοστρύχων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (Vitis vinifera).

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Κουρέτας (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζώων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Δημήτριος Στάγκος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Καλλιόπη Λιαδάκη: Λέκτορας Βιοχημικής Φαρμακολογίας του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Κουρέτα, για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω την μεταπτυχιακή μου εργασία στο εργαστήριο του, όπως επίσης και για όσα πολύτιμα μου δίδαξε.

Ευχαριστώ τον λέκτορα κ. Δημήτριο Στάγκο για την συνεχή και ουσιαστική παρουσία και υποστήριξη του τόσο στα εργαστηριακά πειράματα όσο και στην συγγραφή αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ πολύ τον κ. Νίκο Πορτέση για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια του και για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε προκειμένου να στηρίζει την παρούσα μεταπτυχιακή εργασία.

Επίσης, ευχαριστώ όλη την ομάδα του εργαστηρίου για το συνεργατικό κλίμα που αναπτύχθηκε στο εργαστήριο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ελεύθερες ρίζες και το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι σχετίζονται με πολλές ασθένειες. Τα εκχυλίσματα πολλών φυτών είναι πλούσια σε πολυφαινόλες, στις οποίες έχουν αποδοθεί πολλές σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Στα πλαίσια αυτά, τα τελευταία χρόνια, τα σταφύλια έχουν κερδίσει ένα γενικότερο ενδιαφέρον λόγω του πολυφαινολικού περιεχομένου τους. Από τις πιο σημαντικές βιολογικές δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες των σταφυλιών είναι η αντιοξειδωτική, χημειοπροστατευτική τους δράση. Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες σχετικά με την αντιοξειδωτική/χημειοπροστατευτική δράση της αμπέλου έχουν γίνει σε εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού και κυρίως από τα γίγαρτα. Μελέτες όμως έχουν δείξει ότι και οι βόστρυχοι του φυτού είναι πλούσιοι σε πολυφαινολικό περιεχόμενο. Έτσι, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων βόστρυχων από ελληνικές ποικιλίες του *Vitis Vinifera* (άμπελος) καθώς και εκχυλισμάτων από γίγαρτα και στέμφυλα ως συγκριτικά δεδομένα. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις *in vitro* μέθοδοι. Οι δύο πρώτες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από τις πολυφαινολικές ενώσεις και προέκυψε ότι τα περισσότερα εκχυλίσματα βόστρυχων παρουσίασαν ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης και των δύο ριζών. Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στη διαφορετική φύση των ριζών και στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η ικανότητά των εκχυλισμάτων να προστατεύουν το DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων που οφείλονται στην δράση ελευθέρων ριζών και συγκεκριμένα των ριζών περοξυλίου (ROO[•]) και ριζών υδροξυλίου (OH[•])

Η αναστολή της μετατροπής της υπερελικομένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική, αντικατοπτρίζει κάποιον μηχανισμό αντιοξειδωτικής, αντιμεταλλαξιγόνου δράσης. Οι ρίζες περοξυλίου (ROO[•]) και υδροξυλίου (OH[•]) παράχθηκαν από τη θερμική διάσπαση του 2,2'-Azobis 2-amidinopropane hydrochloride (AAPH) και τη φωτόλυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) παρουσία υπεριώδους (UV) ακτινοβολίας

αντίστοιχα. Τα περισσότερα εκχυλίσματα επέδειξαν εξαιρετική προστατευτική δράση απέναντι στη επαγόμενη από τις παραπάνω ρίζες βλάβη του DNA. Παρόλα αυτά, τα συγκεκριμένα εκχυλίσματα ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι της επαγόμενης τοξικής δράσης ριζών περοξυλίου (ROO^\bullet) σε σχέση με την αντίστοιχη δράση των ριζών υδροξυλίου (OH^\bullet) υποδηλώνοντας και ένα διαφορετικό μηχανισμό χημειοπροστατευτικής δράσης των περιεχόμενων πολυφαινόλων τους. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δίνουν σημαντικές ενδείξεις για την αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων των ελληνικών ποικιλιών.

ABSTRACT

The free radicals and the oxidative stress are considered to be related to many diseases. The extracts derived from many plants are rich in polyphenols. Many significant biological virtues are attributed to polyphenols. In the context of the above, during the latest years, grapes have gained a general interest because of their content in polyphenols. One of the most important biological actions, which are attributed to the polyphenols as contents of grapes, is their antioxidant, chemo preventive action. However, most of the studies for antioxidant / chemo preventive action of vine are about extracts deriving from the fruit of the plant and mostly from the seed. Studies show that bostryx extracts of the plant are rich in polyphenols. So, the aim of the present study was the assessment of the antioxidant action from βοστρύχων extracts deriving from Greek varieties of *Vitis Vinifera* (vine), as well as, of *seed* and *stemfyla* as comparative data. The methods used were four *in vitro*. The first two are based on neutralizing stable chemical radicals DPPH $^\bullet$ and ABTS $^{++}$ from polyphenol compounds. Most of the tested extracts exhibited a significant ability of interaction with both radicals, that is antioxidant action. All the differences observed are attributed to the different nature of the radicals, the different combination and the way the polyphenols (contained in the extracts) act.

In the second part of the study we examined the ability of the extracts to protect the DNA from causing monoclonal fragments which are attributed to the action of free radicals, specifically peroxy (ROO^\bullet) and Hydroxyl (OH^\bullet) radicals.

The suspended conversion of the plasmid's over aged configuration in the open circular or linear, reflects a mechanism of antioxidant, anti mutagenic action. The peroxy (ROO^\bullet) and Hydroxyl (OH^\bullet) radicals were generated from thermal decomposition of 2,2'-Azobis 2-amidinopropane hydrochloride (AAPH) and photolysis of hydrogen peroxide (H_2O_2) under the

presence of ultraviolet (UV) radiation respectively. Most of the extracts exhibited exceptional chemo preventive action against the inductive from the above radicals damage of DNA. In addition, the specific extracts were more effective against the inductive toxic action of ROO[•] radicals comparing to the respective action of OH[•] radicals, a fact which implies a different chemo preventive action mechanism of the polyphenols contained in the extracts. The results of the present study provide significant indications that Greek variety bostryx extracts have antioxidant and chemo preventive action.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.Εισαγωγή	10
1.1 Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και χημειοπροστασία	10
1.2 Ελεύθερες ρίζες	12
1.2.1 Σχηματισμός ελευθέρων ριζών	12
1.3 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες	14
1.4 Οξειδωτικό στρες	15
1.5 Βιολογικές ιδιότητες σταφυλιών	18
1.6 Ανατομία και χημική σύσταση σταφυλιών	20
1.7 Φυτικές πολυφαινόλες	22
1.7.1 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών	24
1.7.2 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών	26
1.7.2.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση	26
1.7.2.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών	29
1.7.2.3 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών	30
Σκοπός του πειράματος	31
2.Υλικά και μέθοδοι	32
2.1 Υλικά	32
2.1.1 Πλασμιδιακό DNA	32
2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια	32
2.1.3 Εκχυλίσματα	32
2.2 Μέθοδοι	33
2.2.1 Μέθοδοι – πρώτο μέρος	34
2.2.1.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH	34
2.2.1.1i Αρχή της μεθόδου	34
2.2.1.1ii Πειραματική διαδικασία	35
2.2.1.1iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση	36
2.2.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ^{•+}	37
2.2.1.2i Αρχή της μεθόδου	37

2.2.1.2ii Πειραματική διαδικασία	38
2.2.1.2iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση	40
2.2.2 Μέθοδοι –δεύτερο μέρος	40
Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA	40
Γενικά	41
2.2.2.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•)	42
2.2.2.1i Αρχή της μεθόδου	42
2.2.2.1ii Πειραματική διαδικασία	42
2.2.2.1iii Στατιστικά ανάλυση	44
2.2.2.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA	45
2.2.2.2i Αρχή της μεθόδου	45
2.2.2.2ii Πειραματική διαδικασία	45
2.2.2.2iii Στατιστικά ανάλυση	47
3. Αποτελέσματα	47
3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH	47
3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS ⁺	61
3.3 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•) και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής-αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους	75
3.4 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους	88
4.Συζήτηση	102
5.Βιβλιογραφία	108
6.Παράρτημα	109

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

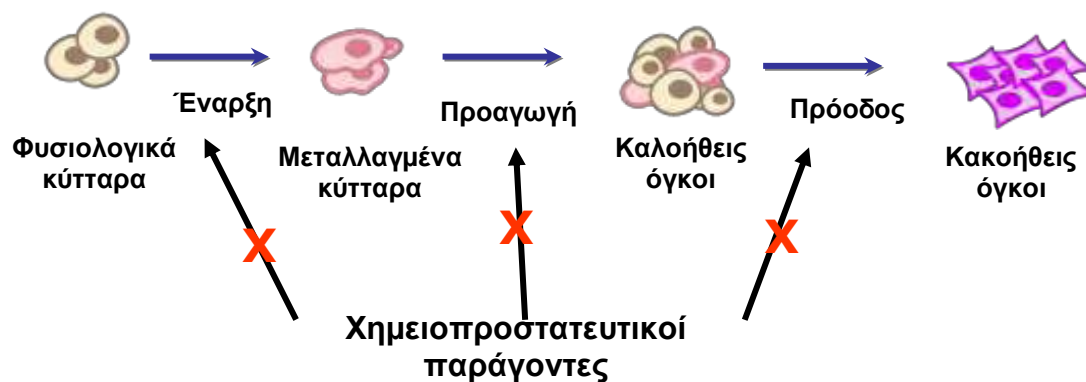
Το 1976 ο Sporn εισήγαγε την έννοια της ‘χημειοπροφύλαξης’ που σημαίνει την πρόληψη της εμφάνισης του καρκίνου μέσω της χορήγησης βιοδραστικών μη θεραπευτικών συστατικών των φυτικών τροφών (τα οποία ονομάζονται φυτοχημικά συστατικά) είτε ως μέρος της διαίτας είτε ακόμα με τη μορφή συμπληρωμάτων διατροφής (Sporn 1976).

Από τότε μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί και αναγνωριστεί μια σειρά «πολύτιμων» φυτοχημικών συστατικών που αναδεικνύουν την απλή καθημερινή διατροφή του ανθρώπου σε ισχυρό σύμμαχο στην πρόληψη κατά του καρκίνου και άλλων σοβαρών ασθενειών.

1.1 Το πολυσταδιακό μοντέλο της καρκινογένεσης και η χημειοπροστασία

Η καρκινογένεση είναι μία μεταβολική ασθένεια και διαίρεται σε τρεις φάσεις (Bishop 2000). Την αρχική (initiation), την φάση προαγωγής (promotion) και την φάση προόδου (progression). Στο πρώτο στάδιο συμβαίνουν οι γενετικές βλάβες στο DNA, στο δεύτερο στάδιο εμφανίζονται οι φαινοτυπικές ανωμαλίες και στο τρίτο στάδιο μέσω σύνθετων μηχανισμών, οι γενετικές και φαινοτυπικές ανωμαλίες. Ο καρκίνος αποτελεί μία πολυσύνθετη διεργασία σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο και χαρακτηρίζεται στις περισσότερες περιπτώσεις από μία εκτεταμένη χρονικά περίοδο μεταξύ της αρχικής φάσης της καρκινογένεσης μέχρι εμφάνισης της νόσου. Έτσι οι μελέτες στην χημειοπροστασία βασίζονται στην υπόθεση, ότι η διακοπή αυτής της μεταβολικής διαδικασίας, σε κάποιο από τα στάδια θα αναστείλει ή θα ανατρέψει την εξέλιξη της καρκινογένεσης.

Τα αποτελέσματα και οι μηχανισμοί της χημειοπροστατευτικής δράσης σε πειραματόζωα και ανθρώπους έχουν γίνει αντικείμενο εκτεταμένης έρευνας τα τελευταία δέκα χρόνια (Greenwald, 1995) (Εικόνα 1).



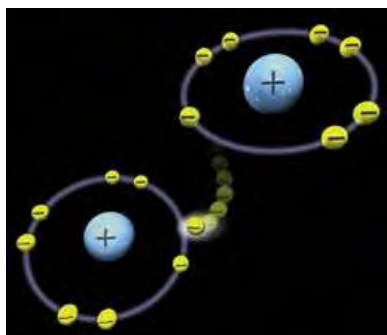
Εικόνα 1 Δράση χημειοπροστατευτικών παραγόντων

Σύμφωνα με την ταξινόμηση που προτάθηκε από τον Wattenberg (Wattenberg 1985) οι παράγοντες που εμφανίζουν χημειοπροστατευτική δράση έναντι του καρκίνου μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες ομάδες: στους ανασταλτικούς παράγοντες (blocking agents) και στους κατασταλτικούς παράγοντες (suppressing agents). Οι ανασταλτικοί παράγοντες εμποδίζουν την προσέγγιση των ιστών-στόχων από τα καρκινογόνα εμπλεκόμενοι στην μεταβολική τους ενεργοποίηση ή στην αλληλεπίδραση των ουσιών αυτών με σημαντικά μακρομόρια του κυττάρου (DNA, RNA, πρωτεΐνες). Οι κατασταλτικοί παράγοντες παρεμποδίζουν την κακοήγη μεταμόρφωση των αρχικών κυττάρων είτε στη φάση προαγωγής είτε στη φάση προόδου.

Οι χημειοπροστατευτικοί παράγοντες μπορούν να παρεμποδίσουν ή να αναστρέψουν το προκαρκινογόνο στάδιο (αρχική φάση και φάση προαγωγής) της πολυσταδιακής καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί δράσης των φυτικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων περιλαμβάνουν το μεταβολισμό των καρκινογόνων παραγόντων από τα ένζυμα του μεταβολισμού, την επιδιόρθωση του DNA, την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, την επίδραση στην κυτταρική διαφοροποίηση και την απόπτωση, την έκφραση και λειτουργική ενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, την επίδραση στην αγγειογένεση και την μετάσταση καθώς και την ορμονική και αυξητική κατάσταση των κακοήθων κυττάρων (Caragay, 1992; Steinmetz et al, 1991).

1.2 Ελεύθερες ρίζες

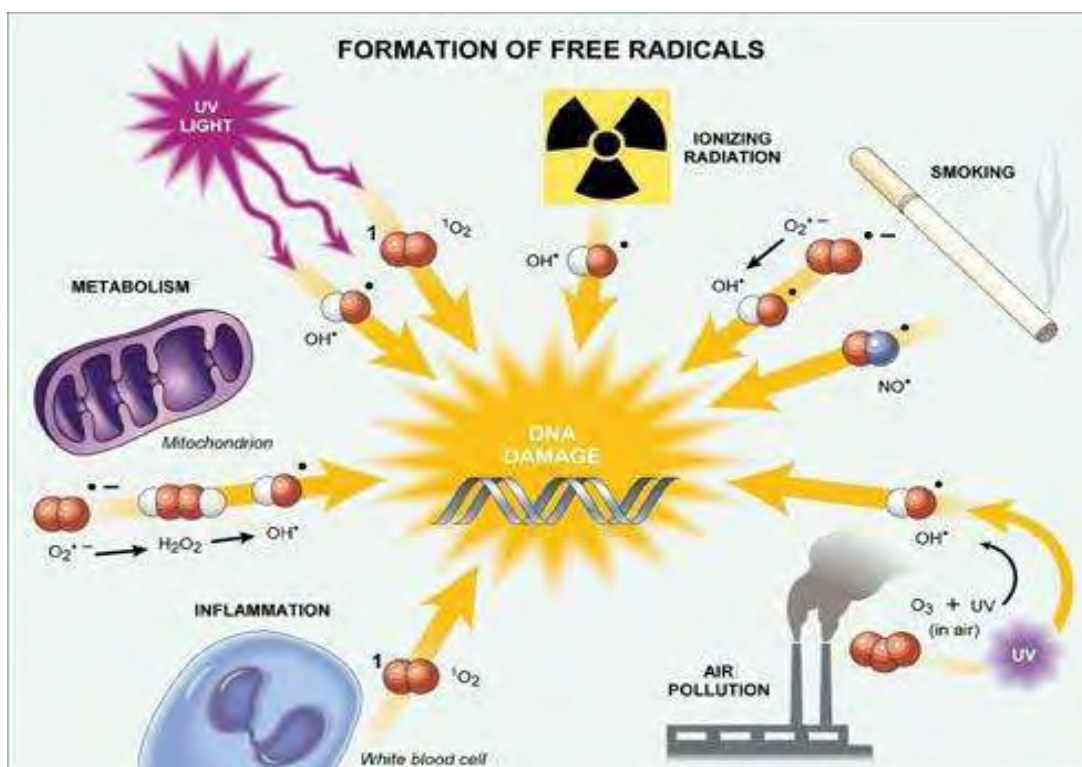
Στα μόρια και τα άτομα, τα ηλεκτρόνια βρίσκονται συνήθως σε ζευγάρια, και κάθε ζευγάρι ηλεκτρονίων κινείται σε μία καθορισμένη περιοχή (σε ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό). Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο, που φέρει ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στοιβάδα του (Gilbert, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). Όσο σταθερότερη είναι μία ελεύθερη ρίζα, τόσο πιο εύκολος είναι ο σχηματισμός της (Valavanidis, 2006). Οι ελεύθερες ρίζες εξουδετερώνονται αντιδρώντας μεταξύ τους ή με άλλες ρίζες, επειδή το ασύζευκτο ηλεκτρόνιο τους προσδίδει αστάθεια και μεγάλη χημική δραστικότητα (Εικόνα 2). Έτσι, αν μια ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια ένωση που δεν είναι ελεύθερη ρίζα, τότε θα παραχθεί μια νέα ρίζα. Η χαρακτηριστική αυτή ιδιότητα καθιστά τις ελεύθερες ρίζες ικανές να συμμετέχουν σε αλυσιδωτές αντιδράσεις (Halliwell & Gutteridge, 1990; Cammac 1987). Αν όμως μία ελεύθερη ρίζα αντιδράσει με μια άλλη τα ασύζευκτα ηλεκτρόνιά τους θα ζευγαρώσουν και η ένωση που θα προκύψει δε θα είναι πλέον ελεύθερη ρίζα (Cheeseman et al, 1993; Wilson, 1978).



Εικόνα 2 Η δραστικότητα της ελεύθερης ρίζας οφείλεται στο ασύζευκτο ηλεκτρόνιο της εξωτερικής στοιβάδας

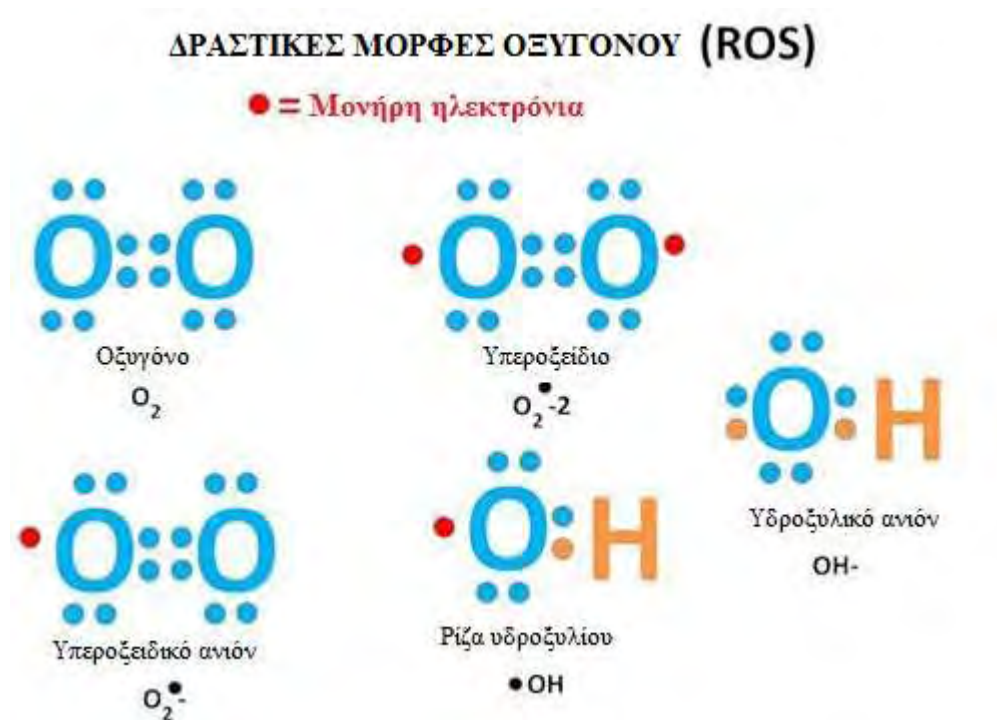
1.2.1 Σχηματισμός Ελευθέρων Ριζών

Οι διάφορες ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν σε αρκετά χημικά και βιολογικά συστήματα, όπως κατά τη διάρκεια σχηματισμού των πλαστικών, παλαίωσης των χρωμάτων, καύσης των καυσίμων καθώς και μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό [Halliwell B, 2001]. Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να σχηματιστούν κατά την αναπνευστική αλυσίδα, από προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα, κατά τη λιπιδική οξείδωση, από την ακτινοβολία, τη φλεγμονή, το κάπνισμα και από την μολυσμένη ατμόσφαιρα. (Εικόνα 3). Οι ελεύθερες ρίζες είναι προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ελεύθερες ρίζες παράγονται ειδικά να εξυπηρετήσουν βασικές βιολογικές λειτουργίες, ενώ, σε άλλες περιπτώσεις, αυτές παράγονται σαν παραπροϊόντα μεταβολικών διαδικασιών.



Εικόνα 3: Τρόποι σχηματισμού των ελευθέρων ριζών (ROS).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα ελευθέρων ριζών που συναντώνται στον οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου (OH^\bullet), του σουπεροξειδίου ($O_2^{\bullet-}$), του μονοξειδίου του αζώτου (NO^\bullet), του αλκοξυλίου (RO^\bullet), του υδροπεροξυλίου (HO_2^\bullet), του τριχλωρομεθυλίου (CCl_3^\bullet) και οιθειούχες ρίζες (RS^\bullet). Από το σύνολο των ελευθέρων ριζών εκείνες, που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον στα βιολογικά συστήματα είναι οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS: Reactive Oxygen Species). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις (εικόνα 4), που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξειδία, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al, 1993; Gutteridge, 1995). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και το υποχλωριώδες οξύ ($COCl$) (Halliwell 2001)



Εικόνα 4: Ασύζευκτα ηλεκτρόνια στις δραστικές μορφές οξυγόνου9(ROS).

1.2 Αντιοξειδωτικοί παράγοντες

Αντιοξειδωτικό θεωρείται οποιαδήποτε ουσία η οποία όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες ενός προς οξείδωση υποστρώματος επιβραδύνει ή εμποδίζει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος [Halliwell B, 2001]. Τα αντιοξειδωτικά ασκούν τη δράση τους, είτε εμποδίζοντας την οξείδωση των ευαίσθητων βιολογικών μορίων από τις ελεύθερες ρίζες, είτε περιορίζοντας τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών [Scalbert A. et al, 2005]. Συγκεκριμένα, τα αντιοξειδωτικά προσφέρουν στις ελεύθερες ρίζες το ηλεκτρόνιο ή το υδρογόνο που τους λείπει και έτσι εμποδίζουν τη δράση τους ή ενεργοποιούν τα ενδογενή αμυντικά συστήματα [Halliwell B, 2001] (Εικόνα 5).



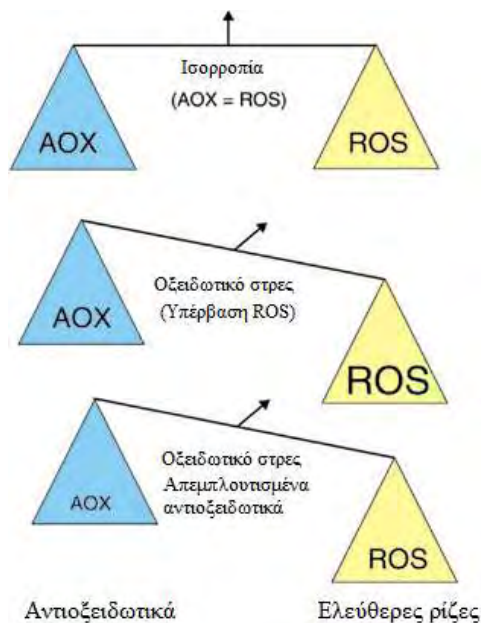
Εικόνα 5: Τρόπος δράσης ενός αντιοξειδωτικού

Οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί χωρίζονται στους ενζυμικούς και μη. Στους ενζυμικούς ανήκουν τα αντιοξειδωτικά ένζυμα τα οποία μετατρέπουν τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε μη δραστικά μόρια δεσμεύοντας τις ελεύθερες ρίζες ή μειώνοντας την παραγωγή τους. Τα πιο σημαντικά, αυτής της κατηγορίας είναι η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η περοξειδάση της γλουταθειόνης (GSHPx), η ρεδουκτάση της γλουταθειόνης (GR) και η καταλάση (CAT).

Στην κατηγορία των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών περιλαμβάνονται συστατικά των τροφών όπως οι βιταμίνες C και E, οι πολυφαινόλες που υπάρχουν σε εκχυλίσματα φυτών, η γλουταθειόνη, οι χηλικοί δεσμευτές μεταβατικών μετάλλων, το ουρικό οξύ και ορισμένες πρωτεΐνες του πλάσματος καθώς και λιποδιαλυτοί παράγοντες, όπως η χολερυθρίνη και το συνένζυμο Q₁₀.

1.4 Οξειδωτικό στρες

Στο υγιές ανθρώπινο σώμα, υπάρχει μία ισορροπία μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και αντιοξειδωτικών συστημάτων άμυνας. Ο όρος οξειδωτικό στρες περιγράφει την κατάσταση ανισορροπίας (Εικόνα 6) ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των δραστικών μορφών οξυγόνου και των αντιοξειδωτικών αμυντικών μηχανισμών (Halliwell & Gutteridge, 1990; Dotan, 2004).

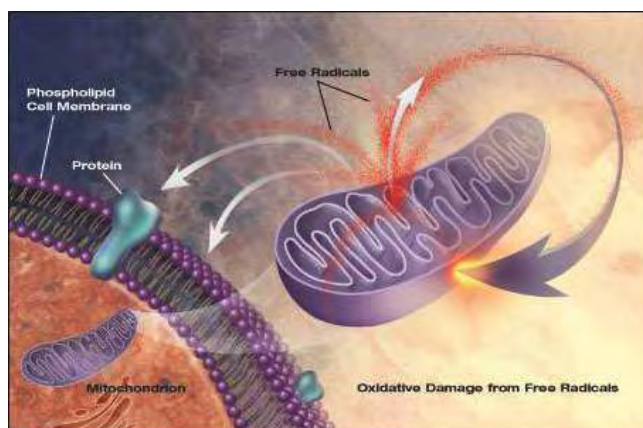


Εικόνα 6 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

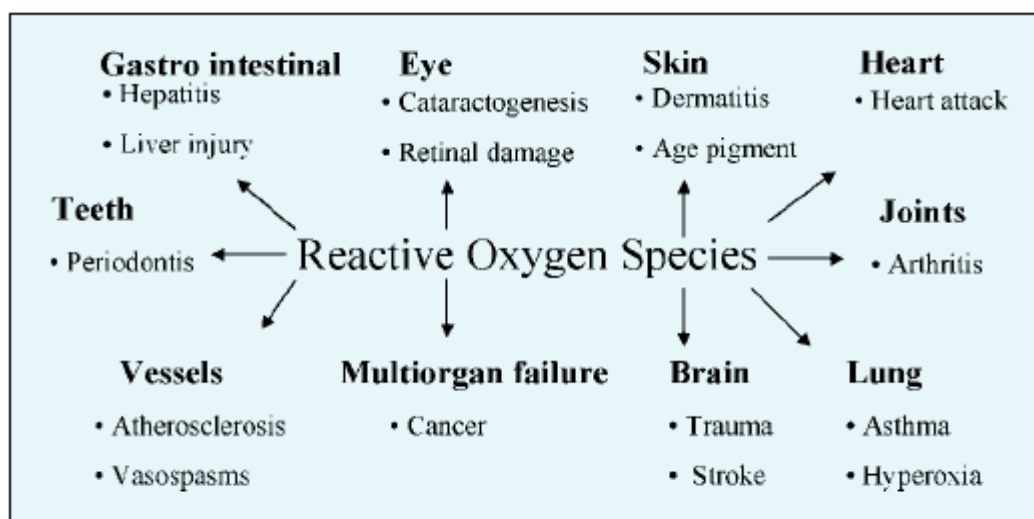
- Παρουσία τοξικών ουσιών, που μεταβολίζονται και παράγουν ROS
- Υπερβολική ενεργοποίηση των συστημάτων παραγωγής ROS
- Σχετική ανεπάρκεια των αντιοξειδωτικών παραγόντων

Μια ελεύθερη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με όλα τα βιομόρια, που είναι βασικά συστατικά του κυττάρου με αποτέλεσμα να συμβαίνουν αλυσιδωτές αντιδράσεις με συνέπεια την ολοκληρωτική καταστροφή του βιολογικού υποστρώματος. (Εικόνα 7). Έτσι οι πρωτεΐνες, που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν εύκολα με ελεύθερες ρίζες, προσβάλλονται πιο εύκολα και μετουσιώνονται (Lyra et al, 1977). Οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, και να προκαλέσουν βλάβες τόσο στις βάσεις (πυρίνες, πυριμιδίνες) όσο και στη D –ριβόζη του DNA με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεταλλάξεις. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση και σχετίζονται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994).



Εικόνα 7 Το DNA, οι πρωτεΐνες και τα λιπίδια αποτελούν τους στόχους των ελεύθερων ριζών

Ο κατάλογος των ασθενειών, που ξεπερνούν τις 100 (Halliwell, 2001) , για τις οποίες έχουν ενοχοποιηθεί σε μεγαλύτερο ή μικρότερο βαθμό οι ελεύθερες ρίζες, αυξάνεται συνεχώς (εικόνα 8) και περιλαμβάνει τον καρκίνο (Toyokuni 1998), τις καρδιαγγειακές παθήσεις (Singal, 1998), τις νευροεκφυλιστικές ασθένειες (Evans, 1993), την αθηροσκλήρυνση (Halliwell, 1994), το AIDS (Baruchel & Wainberg, 1992), την ηπατίτιδα (Elliot and Strunin, 1993) και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα (Parke et al., 1991) και κ.ά.). Για παράδειγμα, σύμφωνα με τη θεωρία του ‘πολυσταδιακού μοντέλου’, οι μεταλλάξεις αποτελούν βασικό παράγοντα και στα τρία στάδια της καρκινογένεσης: την έναρξη (initiation), την προαγωγή (promotion) και την πρόοδο (progression) (Κουρέτας 2003). Η έναρξη, το πρώτο στάδιο, προκαλείται από τη δημιουργία μη αντιστρεπτών βλαβών στο DNA (πιθανότατα σε γονίδια που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και την απόπτωση) σε ένα ‘αρχικό κύτταρο’ (initiated cell) που βρίσκεται κάτω από την επίδραση ενός μεταλλαξιγόνου παράγοντα. Έτσι δημιουργείται ένα κύτταρο που μπορεί να εκτελεί μεγαλύτερο αριθμό μιτώσεων από ότι κανονικά θα έκανε (Trosko και Chang 1989). Στο δεύτερο στάδιο, την προαγωγή, τα αρχικά μεταλλαγμένα κύτταρα πολλαπλασιάζονται κάτω από την επίδραση μιτογόνων παραγόντων (προαγωγέων) με τελική κατάληξη το σχηματισμό ενός κλώνου από μεταλλαγμένα κύτταρα. Σε ένα από αυτά τα κύτταρα, μία ‘κρίσιμη’ μετάλλαξη το μετατρέπει στο πρώτο προ-καρκινογόνο κύτταρο. Η προαγωγή συνήθως διαρκεί αρκετά χρόνια και είναι ένα αντιστρεπτό στάδιο αφού αφαίρεση του προαγωγέα συχνά έχει ως αποτέλεσμα ο ιστός να επανέρθει στην φυσιολογική του κατάσταση αν και θα περιέχει ‘αρχικά κύτταρα’ (Trosko και συν., 1983). Στο τελικό μη αντιστρεπτό στάδιο, την πρόοδο, το προ-καρκινικό κύτταρο μετατρέπεται σε καρκινικό εξαιτίας νέων μεταλλάξεων που έχουν ως αποτέλεσμα την έκφραση του καρκινικού φαινότυπου, δηλαδή ενός κυτταρικού κλώνου με αυξημένη ικανότητα πολλαπλασιασμού, διείσδυσης και μετάστασης (Kerbel και συν., 1984).



Εικόνα 8 : Κλινικές καταστάσεις με τις οποίες έχει βρεθεί ότι σχετίζονται τα ROS (Lee et al., 2003).

Σήμερα η ‘χημειοπροφύλαξη’, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους για την πρόληψη όχι μόνο του καρκίνου αλλά και μιας σειράς άλλων χρόνιων παθήσεων (Hong και Sporn 1997; Liu 2003). Γενικά, μία σειρά από επιδημιολογικές και *in vivo* μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη κατανάλωση φυτικών τροφών παίζει σημαντικό χημειοπροστατευτικό ρόλο, γιατί συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο για προσβολή από ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, η στεφανιαία νόσος και γενικότερα οι ασθένειες του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς και διάφορες νευροεκφυλιστικές νόσοι (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) (Willett 2002; Nepka και συν., 1999; Huang και συν., 1994; Joseph και συν., 1999; Tijburg και συν., 1997). Επιπλέον τα φυτοχημικά συστατικά χρησιμοποιούνται ευρύτατα για την παρασκευή φαρμάκων καθώς σε ένα μεγάλο ποσοστό των σύγχρονων χρησιμοποιούμενων φαρμάκων οι δραστικές τους ουσίες είναι ή προέρχονται από τέτοια συστατικά (Colic και Pavelic 2000).

1.5 Βιολογικές ιδιότητες σταφυλιών

Η άμπελος είναι ένα αγγειόσπερμο φυτό του οποίου ο καρπός (τα σταφύλια) και το κύριο εμπορικό παράγωγο του (το κρασί) παρουσιάζουν σημαντικές βιολογικές ιδιότητες. Η άμπελος ανήκει στην οικογένεια *Vitaceae*, με σημαντικότερο είδος το *Vitis vinifera*, το οποίο είναι το κυριότερο οινοπαραγωγικό φυτό. (εικόνα 9)



Εικόνα 9: *Vitis vinifera*

Το *Vitis vinifera* πιθανότατα προέρχεται από τα όρη του Καυκάσου και πιστεύεται ότι είναι ένα από τα πρώτα φυτά που άρχισε να καλλιεργεί ο άνθρωπος. Μάλιστα υπάρχουν ιστορικές αποδείξεις που δείχνουν ότι η συστηματική καλλιέργειά του ξεκίνησε πριν από περίπου 6.000 χρόνια (Soleas και συν., 1997). Τα τελευταία χρόνια έχει δοθεί ιδιαίτερη σημασία στις βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών και του κρασιού κυρίως ύστερα από μία έρευνα (Renaud και de Lorgeril 1992) που πρότεινε ως εξήγηση στο λεγόμενο ‘γαλλικό παράδοξο’ την κατανάλωση κρασιού. ‘Γαλλικό παράδοξο’ έχει ονομαστεί η παρατήρηση ότι στη Γαλλία υπάρχουν μικρότερα ποσοστά καρδιακών παθήσεων σε σύγκριση με άλλες ανεπτυγμένες χώρες, αν και η κατανάλωση τροφών πλούσιων σε λιπαρά, το κάπνισμα, η έλλειψη σωματικής άσκησης καθώς και οι τιμές άλλων δεικτών υψηλού κινδύνου για καρδιοπάθειες δεν διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στη Γαλλία και στις άλλες χώρες. Η προστασία των σταφυλιών και του κρασιού έναντι των καρδιακών παθήσεων πιστεύεται ότι οφείλεται στην αντι-αθηρωματική δράση τους βελτιώνοντας τη λειτουργία του ενδοθηλίου (Chou και συν., 2001), αυξάνοντας την αντιοξειδωτική ικανότητα του ορού και προστατεύοντας έτσι από οξείδωση τη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (LDL) (Day και συν., 1997), και ελαττώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (Keevil και συν., 2000). Επιπλέον, επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η μέτρια κατανάλωση κρασιού ίσως συνδέεται με προστασία από κάποιες μορφές καρκίνου (Boffetta και Garfinkel 1990; Renaud και συν., 1998). Επίσης, εκχυλίσματα από σπέρματα σταφυλιών ανέστειλαν σε *in vivo* πειράματα την ανάπτυξη μοσχεύματος από ανθρώπινο καρκίνο του προστάτη (Singh και συν.,

2004), ενώ *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι εκχυλίσματα από σταφύλια παρουσίασαν κυτταροτοξικότητα έναντι ανθρώπινων κυτταροκαλλιιεργειών από καρκινικά κύτταρα του μαστού, του προστάτη, του εντέρου και του πνεύμονα ενώ ενίσχυσαν την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων (Agarwal και συν., 2000α; Agarwal και συν., 2000β; Ye και συν., 1999; Bagchi και συν., 2002). Άλλες βιολογικές ιδιότητες που έχουν αποδοθεί σε εκχυλίσματα σταφυλιών είναι αντιοξειδωτικές (Bagchi και συν., 2000), αντιμικροβιακές (Weisse και συν., 1995), δράση κατά του έλκους (Saito και συν., 1998) και αντιυπερτασικές (Soares De Moura και συν., 2002).

1.6 Ανατομία και χημική σύσταση σταφυλιών

Το σταφύλι και πιο συγκεκριμένα ο βότρυς του σταφυλιού (εικόνα 10) απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχας ή τσαμπί και τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού. Τα στέμφυλα είναι το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους (κοτσάνια), τα γίγαρτα (κουκούτσια) και τους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό γλεύκους (αζύμωτου ή εν ζυμώσει) ή κρασιού ανάλογα με το βαθμό έκθλιψης / πίεσης τους.



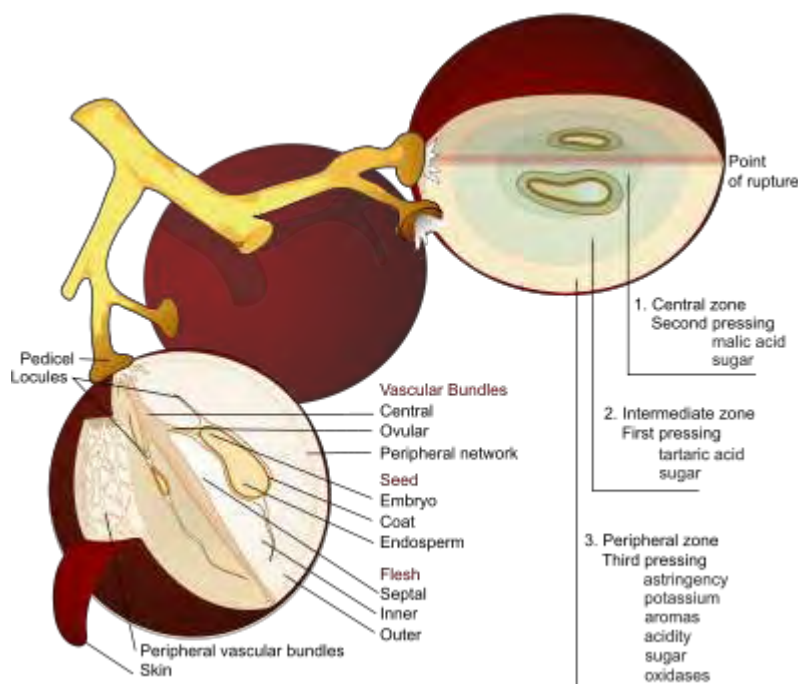
Εικόνα 10 : Βότρυς σταφυλιού.

Η επί της εκατό αναλογία των δυο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία αυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, την ηλικία των πρεμνών, το χρόνο του τρυγητού, την προσβολή από διάφορες ασθένειες και γενικά από κάθε παράγοντα που θα επηρέαζε το μέγεθος του βότρυ. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχας, σε σχέση με το σύνολο των ραγών. Κατά μέσο όρο πάντως, η σύνθεση του σταφυλιού κυμαίνεται στις παρακάτω αναλογίες:

- βόστρυχας 3-7% κατά βάρος και 30% κατ' όγκο

- ράγες 93 -97% κατά βάρος και 70% κατ' όγκο

Το συστατικό που περιέχεται σε μεγαλύτερη αναλογία στο βόστρυχα είναι το νερό, το οποίο αρχικά μπορεί να φτάσει μέχρι και 90% κατά βάρος. Στη συνέχεια και ανάλογα με το βαθμό ξυλοποίησης των ιστών του ή ξήρανσης του, το νερό περιορίζεται στο 65-75%. Η μείωση του νερού στο βόστρυχα έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ξηρής ουσίας αυτού, η οποία από 10 % μπορεί να φτάσει στο 25-35 % κατά βάρος ή σε μεγαλύτερα ακόμη ποσοστά σε μερικές περιπτώσεις. Το μεγαλύτερο μέρος της ξηρής ουσίας αποτελείται από τις ξυλώδεις ουσίες, ενώ το υπόλοιπο περιλαμβάνει κυρίως ταννίνες (2-4 % κατά βάρος). Η ράγα αποτελείται από το φλοιό, το σαρκώδες μέρος ή σάρκα και τα γίγαρτα με την ακόλουθη εκατοστιαία σύνθεση κατά βάρος: Φλοιός 10-20%, σάρκα 74-87%, γίγαρτα 3-6%. Τα τελευταία σε μερικές περιπτώσεις λείπουν τελείως. Τα ποσοστά αυτά κυμαίνονται ανάλογα με τη ποικιλία του σταφυλιού, τις εδαφοκλιματολογικές συνθήκες και το βαθμό ωρίμανσης. Η ανατομία (Εικόνα 11) και η σύσταση του καθενός από τα μέρη της ράγας παρουσιάζονται παρακάτω (Σουφλερός, 2000).



Εικόνα 11 : Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού.

Αν και τα τελευταία 30-40 χρόνια έχει γίνει σημαντική πρόοδος όσον αφορά τη χημική σύσταση των σταφυλιών και του κρασιού, ωστόσο δεν είναι πλήρως γνωστή. Περισσότερες από 500 χημικές ουσίες έχουν αναγνωριστεί από τις οποίες οι 150 περίπου είναι εστέρες. Μεταξύ αυτών των ενώσεων περιλαμβάνονται το νερό (η συγκέντρωση του οποίου παίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών), σάκχαρα (με κυριότερα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη ενώ η σουκρόζη συναντάται σπανιότερα), οργανικά οξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Οι περισσότερες ενώσεις βρίσκονται σε συγκεντρώσεις 10^{-1} - 10^{-6} mg/lit ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση >100 mg/lit οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάμε στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson 1993).

1.7 Φυτικές πολυφαινόλες

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι μία μεγάλη και ετερογενής κατηγορία χημικών ενώσεων που παράγονται ως δευτερογενείς μεταβολίτες από τα φυτά. Ως σήμερα έχουν αναγνωριστεί χιλιάδες τέτοιων ενώσεων σε πολλά ανώτερα φυτά, ενώ εκατοντάδες από αυτές έχουν αναγνωριστεί στα εδώδιμα φυτά, προϊόντα των οποίων αποτελούν τρόφιμα της καθημερινής διατροφής όπως τα φρούτα, τα λαχανικά, τα σταφύλια, το κρασί, στα δημητριακά, ο καφές και το τσάι.

Το κοινό χαρακτηριστικό των πολυφαινολών είναι η ύπαρξη τουλάχιστον ενός αρωματικού (βενζολικού) δακτυλίου και μίας ή περισσότερων υδροξυλικών ομάδων δεσμευμένων στους άνθρακες των δακτυλίων. Στην φύση απαντώνται κυρίως με την μορφή γλυκοζιτών παρά σε ελεύθερη μορφή με το σάκχαρο που συμμετέχει να είναι γλυκόζη, γαλακτόζη, ξυλόζη, ραμνόζη, αραβινόζη καθώς και άλλα σάκχαρα. Ως προς την διαλυτότητά τους παρουσιάζουν ετερογένεια γιατί μερικές από τις ενώσεις είναι διαλυτές μόνο σε οργανικούς διαλύτες, άλλες είναι υδατοδιαλυτές, ενώ άλλες είναι ισχυρά αδιάλυτα ισομερή (Καράταγλης, 1994). Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Οι δύο βασικές κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται είναι τα φλαβονοειδή και τα μη φλαβονοειδή τα οποία με την σειρά τους χωρίζονται στα φαινολικά οξέα, τα στιλβένια, και τα λιγνάνια. Η ποσότητα και η σύνθεση των βιολογικά ενεργών μορίων που υπάρχουν στα σταφύλια και τα προϊόντα τους ποικίλουν ανάλογα με το είδος, την ποικιλία, την ωριμότητα, της συνθήκες της εποχής, την περιοχή παραγωγής και την απόδοση του φρούτου.

Οι κυριότερες πολυφαινόλες του σταφυλιού είναι τα φλαβονοειδή και συγκεκριμένα είναι οι ανθοκυανίνες και οι φλαβανόλες στα κόκκινα και στα λευκά αντίστοιχα. Γενικά τα κόκκινα σταφύλια περιέχουν περισσότερες πολυφαινόλες σε σχέση με τα λευκά.

Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινολών και περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι (Α και Β) που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου (C) που περιέχει οξυγόνο, δηλαδή παρουσιάζουν τη δομή (C6-C3-C6).

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών. Στις ανθοκυανίνες οφείλεται ο χρωματισμός των ανθέων και των καρπών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού.

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή είναι τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος.

Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων.

Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της δίαιτας (Σχήμα 1.4). Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη (resveratrol) που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτύλιους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli και συν., 1998).

Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas και συν., 1997).

Τα λιγνάνια ανήκουν στην ομάδα των φυτοοιστρογόνων μαζί με τα φλαβονοειδή και τις κουμπεστάνες. Εμφανίζουν ένα διφαινυλικό δακτύλιο που καθιστά τη δομή τους όμοια με τα ενδογενή οιστρογόνα. Απομονώνονται από τα ξυλώδη μέρη των φυτών, τα επικαλύμματα των σπόρων και τους αλεσμένους κόκκους. Φυτικά λιγνάνια είναι η ματαιρεσινόλη (matairesinol)

και η σεκοϊσολαρισιρεσινόλη (secoisolariciresinol) ενώ τα ζωικά τους παράγωγα είναι η εντεροδιόλη (enterodiol) και η εντερολακτόνη (enterolactone). Βρίσκονται κυρίως στους φυτικούς κόκκους, στα φρούτα και τα λαχανικά. Μία από τις πιο γνώστες δράσεις τους είναι η αναστολή της προκαλούμενης από ορμόνη καρκινογένεσης αφού δρουν σαν οιστρογόνα ενώ εμφανίζουν και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Webb et Cullough, 2005).

1.7.1 Μεταβολισμός και βιοδιαθεσιμότητα φυτικών πολυφαινολών

Για την κατανόηση των επιδράσεων των φυτικών πολυφαινολών στην ανθρώπινη υγεία, είναι απαραίτητο να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο μεταβολίζονται. Ίσως για παράδειγμα ορισμένες από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στις διάφορες τροφές να μην είναι ιδιαίτερα δραστικές μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό ή να απορροφώνται σε μικρό βαθμό από το έντερο ή να αποβάλλονται πολύ γρήγορα. Πιστεύεται ότι η μέση πρόσληψη πολυφαινολών σε άτομα που τρώνε καθημερινά φυτικές τροφές είναι περίπου 1gr ανά ημέρα (Kuhnau 1976; Radtke και συν., 1998; Santos-Buelga και Scalbert 2000). Τα δύο τρίτα αυτής της ημερήσιας πρόσληψης πιστεύεται ότι είναι φλαβονοειδή και το ένα τρίτο πολυφαινολικά οξέα (Scalbert και Williamson 2000). Ο μεταβολισμός των πολυφαινολών γίνεται μέσω ενός μονοπατιού που ακολουθείται γενικά για το μεταβολισμό των φαρμάκων (Scalbert και Williamson 2000). Οι αγλυκόνες (δηλαδή οι πολυφαινόλες που δεν είναι συνδεδεμένες με σάκχαρα) απορροφώνται από το λεπτό έντερο. Όμως πολλές από τις πολυφαινόλες που βρίσκονται στις τροφές με τη μορφή γλυκοσιδίων ή πολυμερών είναι αρκετά υδρόφιλες για να απορροφηθούν με παθητική διάχυση από το έντερο και έτσι πρέπει να υδρολυθούν από ένζυμα του εντέρου ή από την εντερική μικροχλωρίδα πριν απορροφηθούν κυρίως από το παχύ έντερο (Hollman και Katan 1997). Όταν η υδρόλυση γίνεται από τα βακτήρια του εντέρου τότε συνήθως μειώνεται η απορρόφηση των πολυφαινολών γιατί οι αγλυκονικές μορφές που σχηματίζονται αποικοδομούνται περαιτέρω σε διάφορα αρωματικά οξέα (Scheline 1991). Επιπλέον, έχει προταθεί (Hollman και συν., 1995) ότι κάποια γλυκοσίδια μεταφέρονται στα εντεροκύτταρα από τη μεμβρανική πρωτεΐνη μεταφοράς γλυκόζης που εξαρτάται από νάτριο (SGLT1) και στη συνέχεια υδρολύονται από την κυτταροπλασματική β-γλυκοσιδάση ή από την υδrolάση της φλοριζινικής λακτάσης (LPH). Οι ανθοκυανιδίνες (κατηγορία φλαβονοειδών) πρέπει να απορροφώνται και να μεταβολίζονται με διαφορετικό

μηχανισμό από τις άλλες πολυφαινόλες γιατί βρίσκονται στο πλάσμα του αίματος με τις γλυκοσιδικές τους μορφές (Passamonti και συν., 2002). Οι πολυμερείς μορφές των πολυφαινολών όπως οι προκυανιδίνες (ανήκουν στα φλαβονοειδή) πιστεύεται ότι απορροφώνται σε μικρό βαθμό και ότι η όποια βιολογική δράση τους περιορίζεται στην περιοχή του εντέρου (Deprez και συν., 2001).

Διάφορες χημικές ομάδες, οι οποίες είναι κυρίως θεικές, μεθυλικές και γλυκουρονικές, προστίθενται στις πολυφαινόλες κατά την απορρόφησή τους από το λεπτό έντερο αλλά και στο ήπαρ (οι κυριότεροι όμως μεταβολίτες των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος είναι τα γλυκουρονίδια) και η προσθήκη αυτών των ομάδων καταλύεται από θειοτρανσφεράσες, μεθυλτρανσφεράσες, και από γλυκουρονικές τρανσφεράσες αντίστοιχα (Manach και συν., 2004). Η προσθήκη αυτή συμβαίνει σε όλες τις ξενοβιοτικές ουσίες με σκοπό να γίνουν περισσότερο υδρόφιλες και έτσι να περιοριστεί η τοξική δράση τους καθώς διευκολύνεται η απέκκριση τους είτε μέσω της χολής είτε με τα ούρα. Για τα περισσότερα φλαβονοειδή ένα σημαντικό ποσοστό των γλυκουρονιδίων που σχηματίζονται στο βλεννογόνο του εντέρου εκκρίνεται πίσω στον εντερικό αυλό και έτσι μειώνεται η καθαρή απορρόφησή τους (Crespy και συν., 1999). Οι μεταβολίτες των πολυφαινολών δεν βρίσκονται στο πλάσμα σε ελεύθερη μορφή αλλά συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος και κυρίως με την αλβουμίνη (Boulton και συν., 1998). Η επίδραση της σύνδεσης των πολυφαινολών με την αλβουμίνη στις βιολογικές τους δράσεις δεν είναι γνωστή, αν και μία μελέτη (Dangles και συν., 1999) έδειξε ότι η κερκετίνη (μία από τις πιο κοινές πολυφαινόλες) διατηρεί την αντιοξειδωτική της δράση μετά τη σύνδεσή της με την αλβουμίνη. Αν και μέχρι σήμερα οι μεταβολίτες λίγων πολυφαινολών είναι γνωστοί, η αναγνώρισή τους είναι σημαντική γιατί μπορεί να έχουν διαφορετική δράση από τις αρχικές πολυφαινόλες.

Η συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση τροφών πλούσιων σε πολυφαινόλες ποικίλλει ανάλογα με την πολυφαινόλη και το είδος της τροφής. Γενικά όμως τα επίπεδα των πολυφαινολών στο πλάσμα κυμαίνονται από μερικές δεκάδες nM έως και 10μM ενώ η μέγιστη συγκέντρωση επιτυγχάνεται από 30 λεπτά έως και 24 ώρες μετά την κατανάλωση των τροφών (Bell και συν., 2000; Graefe και συν., 2001; Lee και συν., 1995; Rein και συν., 2000; Manach και συν., 2004). Μία μελέτη (Duthie και συν., 1998) έδειξε ότι μετά από κατανάλωση 100ml κόκκινου κρασιού (που περιέχει περίπου 500mg πολυφαινολών), η συνολική ποσότητα των πολυφαινολών στο πλάσμα ήταν 15μM. Ήταν όμως ενδιαφέρον ότι η αύξηση της αντιοξειδωτικής δράσης στο πλάσμα αντιστοιχούσε σε 50μM πολυφαινολών, γεγονός που δείχνει ότι είχαν σχηματιστεί μη γνωστοί μεταβολίτες που δεν υπολογίστηκαν στο συνολικό ποσό των πολυφαινολών και οι οποίοι όμως είχαν σημαντική

αντιοξειδωτική δράση. Η διάρκεια ημιζωής των πολυφαινολών στο πλάσμα έχει υπολογιστεί από 2 έως 11 ώρες ανάλογα με τον τύπο της πολυφαινόλης, γεγονός που δείχνει ότι στο πλάσμα θα μπορούσαν να διατηρηθούν οι πολυφαινόλες σε σημαντικές συγκεντρώσεις μετά από τακτική κατανάλωση φυτικών τροφών (Cao και συν., 2001; Bell και συν., 2000; Graefe και συν., 2001). Η απέκκριση των πολυφαινολών γίνεται είτε μέσω της χολής (κυρίως των πολυμερισμένων μορφών) είτε με τα ούρα. Ένα ποσοστό των αγλυκονικών μορφών που αποβάλλεται με τη χολή μπορεί να επαναπορροφηθεί μέσω της εντεροηπατικής κυκλοφορίας (Coldham και Sauer 2000).

Ενώ υπάρχουν αρκετές μελέτες σχετικά με τη συγκέντρωση των πολυφαινολών στο πλάσμα, λίγα είναι τα δεδομένα που αφορούν τη βιοδιαθεσιμότητα των πολυφαινολών στα διάφορα όργανα και ιστούς. Μελέτες που έγιναν με πειραματόζωα δείχνουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις των πολυφαινολών στο πλάσμα και σε διάφορους ιστούς (π.χ. στη μήτρα, στον προστάτη, στο μαστό, στις ωοθήκες) (Fritz και συν., 1998; Chang και συν., 2000; Wang και συν., 2002). Επιπλέον, μπορεί στο πλάσμα να υπερτερούν οι αγλυκονικές μορφές των πολυφαινολών και στους ιστούς οι γλυκοσιδικές ή το αντίστροφο ενώ μπορεί να εμφανίζονται στους ιστούς και διαφορετικοί μεταβολίτες λόγω του ενδοκυτταρικού μεταβολισμού (Hong και συν., 2002; Maubach και συν., 2003).

1.7.2 Βιολογικές ιδιότητες φυτικών πολυφαινολών

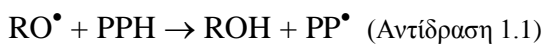
Η μεγάλη εξάπλωση των πολυφαινολών στα φυτά οφείλεται στις πολλές και ποικίλες ιδιότητές τους. Συμβάλλουν στους μηχανισμούς αντίστασής του φυτού απέναντι στην υπεριώδη ακτινοβολία, τις περιβαλλοντικές πιέσεις και την προσβολή από παθογόνα. Οι πολυφαινόλες είναι υπεύθυνες επίσης για το φωτεινό χρώμα των φρούτων και των λαχανικών (Manach C. et al. 2004), συμβάλλοντας έτσι στη γονιμοποίηση των φυτών προσελκύοντας τα έντομα επικονιαστές και στη διασπορά των σπερμάτων μετά την κατανάλωση των καρπών από τα ζώα. Επιπλέον, λειτουργούν ως αναστολείς ενζύμων, ως χηλικές ενώσεις δεσμεύοντας μέταλλα που είναι τοξικά για τα φυτά και ως ρυθμιστές της έκφρασης γονιδίων ενώ εμπλέκονται στις διαδικασίες της μορφογένεσης, του καθορισμού του φύλου και της φωτοσύνθεσης (Manach και συν., 2004; Di Carlo και συν., 1999; Harborne 1986).

1.7.2.1 Αντιοξειδωτική / Προ-οξειδωτική δράση

Η πιο σημαντική ιδιότητα των φυτικών πολυφαινολών που αφορά την επίδρασή τους στην ανθρώπινη υγεία θεωρείται η αντιοξειδωτική τους δράση. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες

που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες είναι ότι δρουν ως αναγωγικοί παράγοντες, ότι δρουν ως δεσμευτές των ελεύθερων ριζών και ότι μπορούν να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα (Blocina et al., 2003; Ferguson, 2001).

Οι φαινολικές τους ομάδες δρουν σαν ισχυροί δέκτες ηλεκτρονίων, σχηματίζοντας σταθερές φαινοξυλικές ρίζες (αντίδραση 1.1). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες ρίζες που έρχονται σε επαφή μαζί τους να δίνουν το ηλεκτρόνιο τους και να αδρανοποιούνται. Η φαινολική ρίζα που παράγεται είναι σταθερή και έχει την ικανότητα να μετατοπίζει το ηλεκτρόνιο έτσι ώστε να μην είναι δραστικό. Με τον τρόπο αυτό αποφεύγονται οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, γεγονός το οποίο προσανξάνει την αντιοξειδωτική δράση των πολυφαινολών. Η ρίζα αυτή μπορεί επιπλέον να αδρανοποιήσει και την αρχική ρίζα η οποία οδήγησε στην παραγωγή της (αντίδραση 1.2) οδηγώντας στη δημιουργία ενός μη δραστικού μορίου (Ferguson et al., 2001).



Όπου : RO^\bullet : η ελεύθερη ρίζα

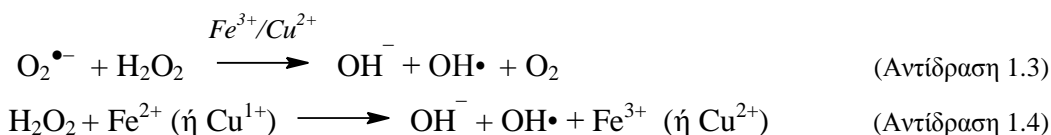
PPH : η πολυφαινόλη

PP^\bullet : η φαινολική ρίζα



Η ικανότητα των πολυφαινολών, και ιδιαίτερα των φλαβονοειδών, να δεσμεύουν χηλικά μέταλλα, αποτελεί μία ακόμη ένδειξη για την αντιοξειδωτική δράση τους αφού μπορούν να δεσμεύουν, πιθανότατα στοχευμένα, ιόντα χαλκού και σιδήρου τα οποία μέσω των αντιδράσεων Haber-Weiss (αντίδραση 1.3) και της αντίδρασης Fenton (αντίδραση 1.4) θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην παραγωγή ιδιαίτερα δραστικών ελεύθερων ριζών (Nijveldt et al., 2001). Η χηλική δέσμευση ενός δισθενούς κατιόντος διατηρεί την ικανότητά τους να δεσμεύουν ελεύθερες ρίζες καθιστώντας τα φλαβονοειδή ισχυρά αντιοξειδωτικά αφού έτσι

προστατεύουν διπλά, από τη μια δεσμεύοντας τις ρίζες και από την άλλη εμποδίζοντας το σχηματισμό τους μέσω της αντίδρασης Fenton (Heim et al., 2002).

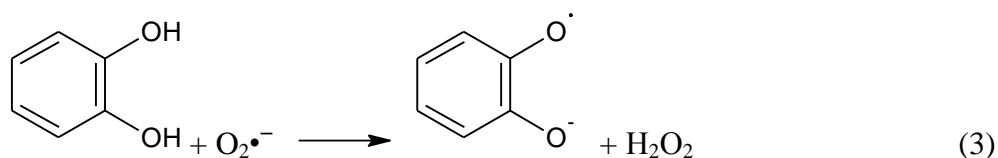
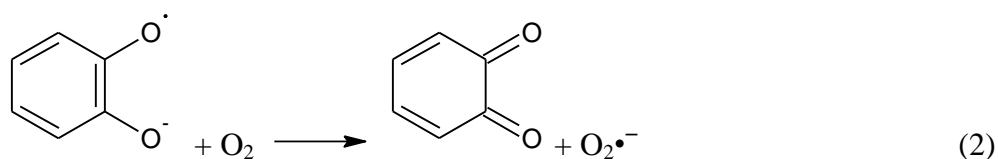
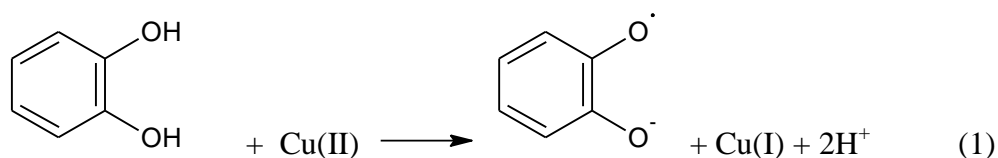


Μια πολυφαινόλη για να θεωρηθεί ότι έχει αντιοξειδωτική δράση θα πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις: i) όταν βρίσκεται σε μικρή συγκέντρωση σε σχέση με μια άλλη ουσία να μπορεί να αναστείλει ή να καθυστερήσει την οξείδωση αυτής της ουσίας, ii) η πολυφαινολική ρίζα που θα προκύψει μετά την αναστολή της οξείδωσης να είναι σταθερή. Οι περισσότερες πολυφαινόλες πληρούν αυτές τις δύο προϋποθέσεις (Rice-Evans και συν., 1996).

Επιπλέον, οι φυτικές πολυφαινόλες μπορούν να αναστέλλουν τη δράση ενζύμων που προκαλούν το σχηματισμό ελευθέρων ριζών, όπως είναι η κυκλοξυγενάση, η λιποξυγενάση (Robak και συν., 1988) και η οξειδάση της ξανθίνης (Chang και συν., 1993). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι επάγουν αντιοξειδωτικά ένζυμα που συμβάλλουν στην απομάκρυνση των ελευθέρων ριζών, όπως είναι η καταλάση, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης και οι υπεροξειδάσες της γλουταθειόνης (Breinhold και συν., 1999). Επιπρόσθετα, έχει προταθεί ότι η επαγωγή των αντιοξειδωτικών ενζύμων μπορεί να γίνεται με άμεση ή έμμεση επίδραση των πολυφαινολών στο στοιχείο της αντιοξειδωτικής απόκρισης (antioxidant response element ή ARE) (Yu και συν., 1997). Το ARE βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή των γονιδίων αρκετών αντιοξειδωτικών ενζύμων και παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της έκφρασής τους.

Οι φυτικές πολυφαινόλες εκτός της αντιοξειδωτικής τους δράσης παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση, δηλαδή μπορεί να προκαλούν το σχηματισμό ΔΜΟ. Οι φυτικές πολυφαινόλες δρουν ως προ-οξειδωτικά κυρίως παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων όπως του Fe και του Cu (Li και Trush 1994; Rahman και συν., 1989). Η παραγωγή ΔΜΟ από τις φυτικές πολυφαινόλες πιστεύεται ότι οφείλεται στην ικανότητά τους να ανάγουν το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} σε Fe^{2+} και Cu^{1+} αντίστοιχα (Yoshino και συν., 1999). Στη συνέχεια οι ανηγμένες μορφές των μετάλλων μέσω της αντίδρασης Fenton οδηγούν στο σχηματισμό OH^\bullet . Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η αντίδραση των πολυφαινολών με το Fe^{3+} ή το Cu^{2+} μπορεί να προκαλέσει μέσω μιας σειράς αντιδράσεων (Σχήμα 1.1) και το σχηματισμό H_2O_2 , το οποίο παίρνει μέρος στην αντίδραση Fenton (Sakihama και συν., 2002). Αυτή η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών είναι πιθανό να οδηγεί σε μεταλλαξιογένεση (Yoshino και συν., 1999) και άρα

έχει προκαλέσει αμφιβολίες όσον αφορά τις θετικές επιδράσεις των πολυφαινολών. Από την άλλη πλευρά όμως πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι οι πολυφαινόλες προκαλούν απόπτωση μέσω της προ-οξειδωτικής δράσης σε καρκινικά κύτταρα ενώ δεν επηρεάζουν τα φυσιολογικά (Yamamoto και συν., 2003; Fukumoto και Mazza 2000).



Σχήμα 1.1 Μηχανισμός προ-οξειδωτικής δράσης πολυφαινολών παρουσία μεταβατικών μετάλλων. Η οξείδωση της πολυφαινόλης από το Cu(II) οδηγεί στο σχηματισμό μιας ημικινόνης (αντίδραση 1), η οποία μπορεί να αντιδράσει με O₂ και να σχηματίσει τη ρίζα του O₂^{•−} (αντίδραση 2). Η αντίδραση αυτή έχει αυτοκαταλυτικό χαρακτήρα, αφού το O₂^{•−} μπορεί να αντιδράσει με την αρχική πολυφαινόλη και να ξανασχηματιστεί η ημικινόνη και H₂O₂ (αντίδραση 3). H₂O₂ μπορεί να σχηματιστεί και από την αντίδραση του O₂^{•−} με H⁺ (αντίδραση 4). Τέλος ο Cu(I) μπορεί να αντιδράσει με το H₂O₂ μέσω της αντίδρασης Fenton και να οδηγήσει στην παραγωγή OH[•] (αντίδραση 5).

1.7.2.2 Αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των πολυφαινολών

Υπάρχουν πολλές αναφορές ότι οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Γενικά ο χαρακτηρισμός μιας ουσίας ως αντιμεταλλαξιγόνου εξαρτάται από την ακριβή χημική δομή της και από το αν η ουσία αυτή ήταν παρούσα πριν ή

κατά την διάρκεια της έκθεσης σε κάποιον μεταλλαξιγόνο παράγοντα. Οι διάφορες αντιμεταλλαξιγόνες δράσεις που έχουν αποδοθεί στις πολυφαινόλες έχουν προκύψει από παρατήρηση της δράσης τους παρουσία κάποιων μεταλλαξιγόνων παραγόντων τόσο σε πειράματα *in vitro*, *in vivo*, καθώς και συνδυασμού *in vivo-in vitro*. Κάποιες από αυτές είναι μη εξειδικευμένες όπως η παρεμπόδιση απορρόφησης των μεταλλαξιγόνων μέσω ενεργοποίησης των ενζύμων του μεταβολισμού. Ωστόσο έχουν αποδοθεί και δράσεις εξειδικευμένες απέναντι σε συγκεκριμένα μεταλλαξιγόνα (Ferguson, 2001).

Γενικά οι διάφοροι μηχανισμοί με τους οποίους οι πολυφαινόλες μπορεί να παρουσιάζουν αντιμεταλλαξιγόνο δράση στις πολυφαινόλες είναι οι ακόλουθοι: επίδραση στην σύνθεση και στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA, επίδραση στην δέσμευση των μεταλλαξιγόνων, όπως το διβενζοπυρένιο, στο DNA, αναστολή της δράσης της τοποϊσομεράσης I/II και τέλος επίδραση στα ένζυμα μεταβολισμού των ξενοβιοτικών ουσιών (Ferguson, 2001).

1.7.2.3 Άλλες σημαντικές βιολογικές δράσεις φυτικών πολυφαινολών

Στις φυτικές πολυφαινόλες, εκτός από την αντιοξειδωτική δράση, έχουν αποδοθεί και μία σειρά από άλλες βιολογικές ιδιότητες. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τροφών που είναι πλούσιες σε πολυφαινόλες συνδέεται με μειωμένο κίνδυνο προσβολής από καρδιοπάθειες (Hertog και συν., 1993; Knekt και συν., 1996) και προστασία από ορισμένες μορφές καρκίνου όπως του προστάτη (Knekt και συν., 2002), του στήθους (Dai και συν., 2002), του γαστρεντερικού συστήματος (Garcia-Closas και συν., 1999) και του πνεύμονα (Le Marchand και συν., 2000). Η προστατευτική αυτή δράση παρέχεται μέσα από ποικίλους αντικαρκινικούς μηχανισμούς. Ακόμη, η πρόσληψη πολυφαινολών μέσω της διατροφής παρέχει κάποιου είδους προστασία έναντι της οστεοπόρωσης (Eaton-Evans 1994 και του έλκους (Alarcon και συν., 1994). Μελέτες έχουν δείξει ότι οι φυτικές πολυφαινόλες παρουσιάζουν αντιϊκές (Chu και συν., 1992) αντιαλλεργικές (Di Carlo και συν., 1999) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Della Loggia και συν., 1986), καθώς και δράση ανάλογη των οιστρογόνων (Manach και συν., 2004).

Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου δράσης εκχυλισμάτων βοστρύχων από το φυτό άμπελος (*Vitis Vinifera*). Για τον προσδιορισμό της αντιοξειδωτικής δράσης χρησιμοποιήθηκαν οι μέθοδοι DPPH και ABTS. Στο δεύτερο μέρος της μελέτης εξετάστηκε η αντιμεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων έναντι βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε πλασμιδιακό DNA στο οποίο και παρατηρήθηκε η αναστολή της πρόκλησης μονόκλωνων θραυσμάτων από παράγοντες που δρουν μέσω δραστικών μορφών οξυγόνου. Ως τέτοιοι παράγοντες χρησιμοποιήθηκαν η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) παρουσία UV ακτινοβολίας και οι πέροξυ ρίζες ($ROO\cdot$) που παράχθηκαν από την θερμική διάσπαση του 2,2'-azobis-(2-amidinopropane hydrochloride) (AAPH).

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Πλασμιδιακό DNA

Πλασμίδιο Bluescript SK-(+) το οποίο απομονώθηκε από βακτηριακή καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα.

2.1.2 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τις τέσσερις μεθόδους ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των παρακάτω εταιριών:

- Tris-HCl (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο νάτριο NaCl (Panreac-Ισπανία)
- EDTA (Panreac-Ισπανία)
- Βορικό οξύ (Boric acid) (Sigma-Γερμανία)
- Αγαρόζη (agarose) (Seakem-Η.Π.Α)
- Χρωστική μπλε της βρωμοφαινόλης (Bromophenol blue) (Research Organics- Η.Π.Α)
- Γλυκερόλη (Glycerol) (Panreac-Ισπανία)
- Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethithium Bromide) (Merck-Γερμανία)
- Χλωριούχο κάλιο (KCl) (Merck-Γερμανία)
- Δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) (Merck-Γερμανία)
- Μονόξινο φωσφορικό νάτριο (Na_2HPO_4) (Merck-Γερμανία)
- DPPH (1,1 διφαινυλ-2-πικρυλνδραζύλιο) (Sigma- Germany)
- ABTS 2,2'-αζινοδις-(3-αιθυλο-βενζοθειαζολίνη-σουλφονικό οξύ) (Sigma- Germany)
- Μεθανόλη (CH_3OH) (Merck- Germany)
- H_2O_2 (Υπεροξειδίο του Υδρογόνου) (Merck- Germany)
- AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride) (Sigma-Γερμανία)

2.1.3 Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν,απομονώθηκαν από βόστρυχους, γίγαρτα και στέμφυλα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*) (Πίνακας 2.1). Η απομόνωση των

εκχυλισμάτων έγινε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε και εκχύλισμα (Grape seed extract) από γίγαρτα που κυκλοφορεί στο εμπόριο.

Πίνακας 2.1: Ποικιλίες αμπέλου από τις οποίες προέκυψαν τα εκχυλίσματα

Ποικιλία	Χρονιά	Τμήμα φυτού ¹
Μαυροτράγανο Σαντορίνης	2006	Βόστρυχοι
Βοηδόματο Σαντορίνης	2006	Βόστρυχοι
Μανδηλαριά Σαντορίνης	2006	Βόστρυχοι
Vinsanto	2006	Βόστρυχοι
Ασύρτικο Σαντορίνης	2006	Βόστρυχοι
Βοηδόματο Σαντορίνης	2007	Βόστρυχοι
Μαυροτράγανο Σαντορίνης	2007	Βόστρυχοι
Ασύρτικο Σαντορίνης	2007	Βόστρυχοι
Βηλάνια Σητεία	2007	Βόστρυχοι
Ασύρτικο Σαντορίνης	2008	Βόστρυχοι
Ξινόμαυρο		Βόστρυχοι
Μοσχάτο Αμβούργου		Βόστρυχοι
Vinsanto		Βόστρυχοι
Ασύρτικο Σαντορίνης	2007	Στέμφυλα
Μανδηλαριά Σαντορίνης	2006	Γίγαρτα
Μαυροδάφνη ΓΠΑ	2007	Γίγαρτα
Αστυρτικο Σαντορίνης	2008	Γίγαρτα
Ξινόμαυρο		Γίγαρτα
Ρομπόλα		Γίγαρτα
Grape seed extract		
Αθήρι Σαντορίνης	2006	Βόστρυχοι
Αθήρι Σαντορίνης	2007	Βόστρυχοι
Μανδηλαριά Σαντορίνης	2007	Βόστρυχοι
Μαυροτράγανο Σαντορίνης	2008	Βόστρυχοι

¹ Τμήμα φυτού από το οποίο προέκυψε το εκχύλισμα

2.2 Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητας των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν συνολικά τέσσερις in vitro μέθοδοι.

2.2.1 Μέθοδοι-πρώτο μέρος

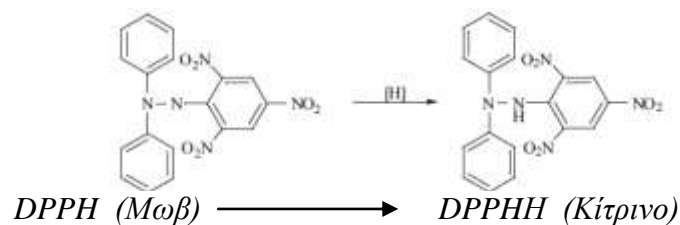
Για την εκτίμηση της συνολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας (Total Antioxidant Activity) των εκχυλισμάτων εφαρμόστηκαν δύο από τις περισσότερο χρησιμοποιούμενες μεθόδους. Αυτές βασίζονται στον προσδιορισμό της ικανότητας των αντιοξειδωτικών ουσιών να εξουδετερώνουν τις ρίζες 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο ή DPPH (Brand-Williams και συν., 1995) και 2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6-σουλφονικό οξύ ή ABTS^{•+} (Rice-Evans και συν., 1996). Πρόκειται για *in vitro* μεθόδους που είναι κατά βάση ποιοτικές και χρησιμοποιούνται για να ανιχνεύσουν αν το δεδομένο συστατικό είναι αντιοξειδωτικό ή όχι. Όμως με τον προσδιορισμό του IC₅₀ μπορούν να ποσοτικοποιήσουν την αντιοξειδωτική δράση (Kaur et al, 2006; Prior et al., 2005; Molyneux, 2004).

2.2.1.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH

2.2.1.1i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος παρουσιάστηκε το 1995 από τους Brand- Williams et al. Ανήκει στις ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους για την εκτίμηση αντιοξειδωτικής ικανότητας φυτικών δειγμάτων (Brand-Williams et al, 1995). Η μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης των αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή αζωτούχα ρίζα 1,1 διφαινυλ-2πικρυλυδραζύλιο (DPPH). Η ρίζα DPPH[•] μπορεί να αδρανοποιηθεί, είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT) (Prior et al., 2005). Η 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) είναι μία σταθερή ρίζα, φέρει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517nm. Όταν προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH[•]) ανάγεται, και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH:H), όπως φαίνεται παρακάτω (Αντίδραση 2.1). Η αναγωγή της ρίζας έχει σαν αποτέλεσμα, την μεταβολή του χρώματος του διαλύματος, από μωβ σε κίτρινο, μεταβολή, που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της

αντιοξειδωτικής ουσίας και την αντίστοιχη μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 517nm. Η μεταβολή της απορρόφησης προσδιορίζεται φωτομετρικά.



Αντίδραση 2.1 Η αναγωγή του DPPH σε DPPH:H

2.2.1.iii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το διάλυμα DPPH[•] την ημέρα του πειράματος και καλύπτεται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητο (1000 μl μεθανόλης στο οποίο εμπεριέχονται 100 μM ρίζας DPPH[•]) και ακολουθεί η προετοιμασία των διαλυμάτων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 80 μg/ml). Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1000 μl. Πρώτα προστίθενται τα διαλύματα της εξεταζόμενης ουσίας, μετά η μεθανόλη και τέλος το διάλυμα της ρίζας (100 μM ρίζας DPPH) με σταθερό γρήγορο ρυθμό, όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.2). Ακολουθεί ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στο σκοτάδι για 20 min, σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση ακολουθεί μέτρηση της απορρόφησης στα 517nm. Η φασματοφωτομέτρηση έγινε με συσκευή Hitachi U-1500 σε πλαστικές κυψελίδες του 1ml. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 mL μεθανόλης (τυφλό). Τα δείγματα που περιείχαν μόνο μεθανόλη και DPPH αποτελούσαν τους θετικούς μάρτυρες. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η ίδια η εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 517nm, μετράται και η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη (Πίνακας 2.3). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα της ρίζας DPPH[•] σε μεθανόλη χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control).

Πίνακας 2.2 Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	900μl	900μl	900μl	900μl	900μl
DPPH [•]	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

Πίνακας 1.3 Έλεγχος απορρόφησης της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50μl	50μl	50μl	50μl	50μl
Μεθανόλη	1000μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl	950μl
V τελ	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml

2.2.1.iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 517nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 517nm

A_s: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 517nm

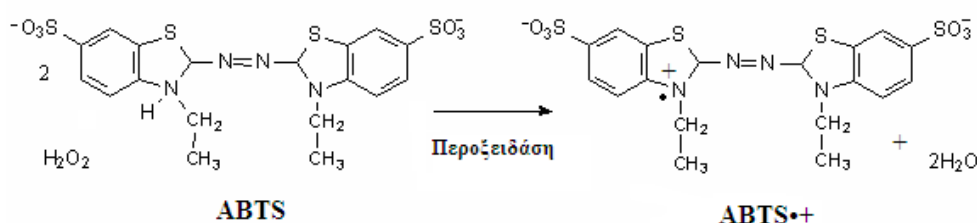
Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του DPPH που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από

τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

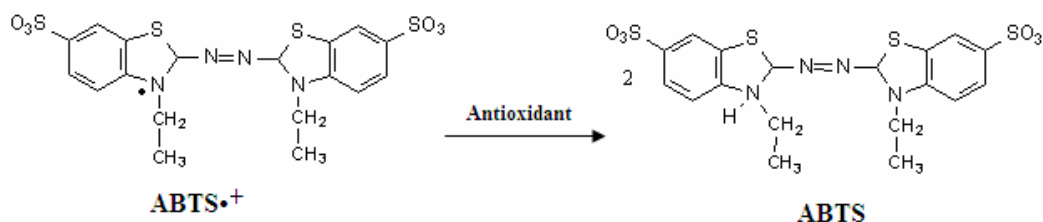
2.2.1.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS^{•+}

2.2.1.2i Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από το Miller (Miller & Rice-Evans, 1993), βασίζεται σε μία αντίδραση αποχρωματισμού. Χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασιζόμενη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης αντιοξειδωτικών μορίων με την σταθερή ρίζα ABTS^{•+}. Το ABTS 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂) μέσω της δράσης του ενζύμου περοξειδάση (HRP), έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση του (ABTS) και την δημιουργία μιας δραστικής ρίζας, του κατιόντος ABTS^{•+} (Αντίδραση 2.2). Η συγκεκριμένη ρίζα έχει κυανοπράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας και στην συνέχεια να ακολουθήσει η προσθήκη της εξεταζόμενης ουσίας. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα ABTS^{•+}, ανάγεται είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (single electron transfer, SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), με αποτέλεσμα τον αποχρωματισμό του διαλύματος σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού και συνέπεια την μείωση της οπτικής απορρόφησης στα 730 nm (Αντίδραση 2.3) (Prior et al., 2005; Miller et al, 1993; Re et al, 1999)



Αντίδραση 2.2 Η οξείδωση του ABTS σε δραστική ρίζα



Αντίδραση 2.3 Η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με την ρίζα ABTS

2.2.1.2ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζονται τα διαλύματα και ακολουθεί η ετοιμασία των αραιώσεων των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων σε διάφορες συγκεντρώσεις (πχ. 5, 10, 20, 80 $\mu\text{g/ml}$).

Διάλυμα ABTS (1mM): Για τελική συγκέντρωση ABTS 1 mM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (500 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 2 mM. Για 10 mL διαλύματος ζυγίζουμε 10.97 mg ABTS και το διαλύουμε σε H_2O .

Διάλυμα H_2O_2 (30 μM): Για τελική συγκέντρωση H_2O_2 30 μM σε τελικό όγκο αντίδρασης 1 mL (50 μl) φτιάχνουμε διάλυμα 600 μM . Από το stock διάλυμα H_2O_2 30% 8,8 M αραιώνουμε με H_2O_2 , ώστε να φτιάξουμε το διάλυμα των 600 μM .

Διάλυμα HRP (6 μM): Διαλύουμε 1mg του ενζύμου σε 10ml αποστειρωμένο νερό. Στη συνέχεια κάνουμε μια αραιώση 1/20 και χρησιμοποιούμε αυτό το διάλυμα για την αντίδραση.

Όλα τα παραπάνω διαλύματα προετοιμάζονται την ημέρα του πειράματος και καλύπτονται με αλουμινόχαρτο γιατί είναι φωτοευαίσθητα. Επιπλέον διατηρούνται σε πάγο κατά την διάρκεια του πειράματος. Ο συνολικός όγκος της αντίδρασης είναι 1050 μl στα οποία προστίθενται κατά σειρά το διάλυμα ABTS, το υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2 και το ένζυμο περοξειδάση. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 45 min. Στην συνέχεια ακολουθεί η προσθήκη του εκχυλίσματος σε διάφορες συγκεντρώσεις, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα. (Πίνακας 2.4). Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και το διάλυμα των παραπάνω αντιδραστηρίων (ABTS, H_2O_2 , HRP) χρησιμοποιείται σαν δείγμα ελέγχου (control). Μετά την επώαση και την προσθήκη των εκχυλισμάτων ακολουθεί ανάδευση και μέτρηση της απορρόφησης στα 730 nm. Επειδή υπάρχει πιθανότητα η

εξεταζόμενη ουσία να απορροφά στα 730 nm, μετράται η απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη χωρίς την παρουσία του ενζύμου (Πίνακας 2.5).

Πίνακας 2.4 Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των αντιδραστηρίων

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ L	400 μ l	400 μ l
ABTS	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ l	500 μ l
H₂O₂	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ l	50 μ l
HRP	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50ml	50ml
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1mL	1mL

Επώαση 45 min

	Τυφλό	Control	C1	C2	C3	C4	C5
Εκχύλισμα	-	-	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l	50 μ l
Μεθανόλη	50 μ l	50 μ l	-	-	-	-	-
V τελ	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l	1050 μ l

Πίνακας 2.5 Έλεγχος απορρόφηση της κάθε εξεταζόμενης συγκέντρωσης σε μεθανόλη

	Τυφλό	C1	C2	C3	C4	C5
H₂O	450 μ L	450 μ L	450 μ L	450 μ L	450 μ L	450 μ L
ABTS	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L	500 μ L
H₂O₂	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
V τελ	1 mL	1 mL	1 mL	1mL	1 mL	1 mL
Εκχύλισμα	-	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L	50 μ L
Μεθανόλη	50 μ L	-	-	-	-	-

2.2.1.2iii Υπολογισμός της αντιοξειδωτικής ικανότητας-Στατιστική ανάλυση

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογίστηκαν οι μέσες τιμές της απορρόφησης στα 730nm για κάθε δείγμα καθώς και η τυπική απόκλιση κάθε μέσης τιμής. Η % αναστολή σχηματισμού (δηλαδή η εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS^{•+} υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100$$

A₀: η οπτική απορρόφηση του θετικού μάρτυρα στα 730nm

A_s: η οπτική απορρόφηση του δείγματος στα 730nm

Για να προσδιοριστεί αν υπήρχαν στατιστικά σημαντικά διαφορές μεταξύ των μέσων τιμών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος one-way ANOVA σε συνδυασμό με το τεστ του Dunnett (οι υπολογισμοί έγιναν με το πρόγραμμα SPSS 13.0). Επίσης, εκτιμήθηκε στατιστικά η συσχέτιση μεταξύ της αναστολής του σχηματισμού της ρίζας του ABTS^{•+} που προκαλούσαν οι εξεταζόμενες ουσίες και της συγκέντρωσής τους με τον προσδιορισμό του συντελεστή συσχέτισης *r* κατά Spearman. Επιπλέον, προσδιορίστηκε το IC₅₀, δηλαδή η συγκέντρωση των εξεταζόμενων ουσιών στην οποία προκαλούσαν μείωση των ριζών του DPPH κατά 50% από τις γραφικές παραστάσεις της μεταβολής της % αναστολής σε συνάρτηση με τις συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων.

2.2.2 Μέθοδοι –δεύτερο μέρος

Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA

Η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιγένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005). Η παρατήρηση λοιπόν της αναστολής της βλάβης του DNA είναι ενδεικτική της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων.

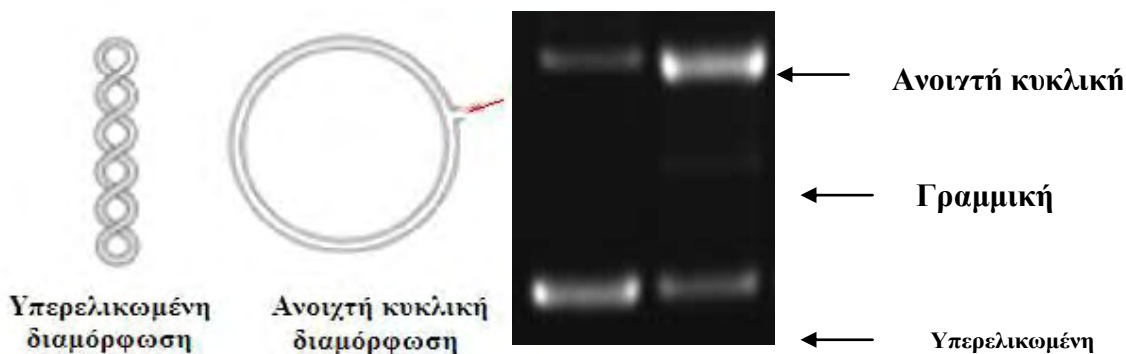
Για την εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης μέσω αναστολής της πρόκλησης βλαβών στο DNA από ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιήθηκαν δύο *in vitro* μέθοδοι, όπου σε κάθε μέθοδο χρησιμοποιήθηκαν οι ρίζες OH[•] και ROO[•] αντίστοιχα.

Γενικά

Για τον προσδιορισμό της αντιμεταλλαξιγόνου δράσης των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε ως μοντέλο πλασμιδιακό DNA. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλωνα κυκλικά μόρια DNA που υπάρχουν στα βακτήρια και τις ζύμες, όπου και αντιγράφονται ως ανεξάρτητες μονάδες. Τα βακτήρια μπορεί να έχουν ένα ή περισσότερα αντίγραφα τα οποία συμβάλλουν στην επιβίωσή τους σε αντίξοες συνθήκες, φέροντας συνήθως γονίδια ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά. Το πλασμιδιακό DNA πλεονεκτεί στο ότι μπορεί να απομονωθεί πολύ εύκολα και σε μεγάλη ποσότητα. Το σημαντικότερο όμως πλεονέκτημα του είναι ότι όταν τρέχει σε ένα gel ηλεκτροφόρησης εμφανίζεται κυρίως σε τρεις διαμορφώσεις (Εικόνα 12).

- Την υπερελικωμένη διαμόρφωση (Supercoiled conformation) στην οποία το πλασμίδιο είναι άθικτο (χωρίς σπασίματα) και αποτελεί την πιο συμπαγώνη μορφή.
- Την ανοιχτή κυκλική (Open circular, relaxed conformation), στην οποία μεταβαίνει όταν προκαλούνται μονόκλωνα σπασίματα. Οι υπερελικώσεις δεν υπάρχουν και αυτό συμβαίνει είτε από ενζυμικούς είτε από άλλους παράγοντες (πχ. ελεύθερες ρίζες) που έχουν την ικανότητα να προκαλούν σπασίματα στο DNA.
- Την γραμμική διαμόρφωση (Linear conformation) στην οποία μεταβαίνει όταν φέρει δίκλωνα σπασίματα.

Οι παραπάνω διαμορφώσεις τρέχουν με διαφορετική ταχύτητα σε ένα gel ηλεκτροφόρησης. Η τελευταία εξαρτάται από το μέγεθος της διαμόρφωσης και μάλιστα όσο πιο μικρή είναι αυτή τόσο πιο γρήγορα διαπερνά τους πόρους της αгарόζης. Άρα το πλασμιδιακό DNA με υπερελικωμένη διαμόρφωση τρέχει πρώτο, δεύτερο εκείνο με τη γραμμική και τρίτο εκείνο με την ανοιχτή κυκλική.



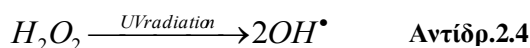
Εικόνα 12: Αλλαγή της διαμόρφωσης του πλασμιδιακού DNA από την πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων (Nicks)

Η εκτίμηση της προστατευτικής δράσης των εξεταζόμενων δειγμάτων απέναντι στην δράση ελευθέρων ριζών και άλλων οξειδωτικών παραγόντων, βασίζεται στην παρεμπόδιση της μετάβασης της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική διαμόρφωση. Με βάση την αρχή της μεθόδου, ως τώρα έχει μελετηθεί η προστατευτική δράση διάφορων φυτικών εκχυλισμάτων και δραστικών μορίων απέναντι στην ικανότητα των ριζών OH^\bullet , ROO^\bullet να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA και να αλλάζουν την διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA.

2.2.2.1 Επαγωγή θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH^\bullet)

2.2.2.1i Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες OH^\bullet είναι από τις πιο ισχυρές δραστικές μορφές οξυγόνου, προσβάλλοντας τόσο το DNA όσο και τις πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Παρουσία UV ακτινοβολίας η ρίζα του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) έχει την ικανότητα να διασπάται οδηγώντας στην παραγωγή ριζών OH^\bullet (Αντίδραση 2.4).



Μία από τις επιδράσεις των ριζών OH^\bullet στο DNA είναι η πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων. Η δράση αυτή σε πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών OH^\bullet .

2.2.2.1ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αγαρόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 gr αγαρόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Κάθε φορά δοκιμαζόταν τα εκχυλίσματα σε συγκεντρώσεις 100, 200, 400, 800, 1200 µg/ml με εξαίρεση το εκχύλισμα Βηλάννα Σητείας 2007 σε συγκεντρώσεις 400, 800, 1600, 3200, 4800 µg/ml.

Πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης γίνεται η προετοιμασία του διαλύματος H_2O_2 συγκέντρωσης 40mM. Το stock διάλυμα H_2O_2 αλλά και το αντίστοιχο αραιωμένο είναι φωτοευαίσθητα, για το λόγο αυτό λαμβάνονται και τα κατάλληλα μέτρα προστασίας τυλίγοντας τα με αλουμινόχαρτο, ενώ πριν την χρησιμοποίησή του διατηρείται στον πάγο.

Τα συστατικά της αντίδρασης (10µl) αποτελούνταν από: 10mM Tris-HCl – 1mM EDTA buffer (pH=7.5), DNA Bluescript plasmid 3,2µg, H_2O_2 40mM, H_2O και το εξεταζόμενο υδατικό εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 2.6.

Πίνακας 2.6 Ποσότητες αντιδραστηρίων.

	Tris-HCl	EDTA	H_2O	αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	H_2O_2	UV
Control	2µl		6µl	-	2µl	-	(-)
H_2O_2 +UV	2µl		4µl	-	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (100 µg/ml)	2µl		1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (200 µg/ml)	2µl		1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (400 µg/ml)	2µl		1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (800 µg/ml)	2µl		1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ. (1600 µg/ml)	2µl		1µl	3µl	2µl	2µl	(+)
Εκχ.μόνο	2µl		3µl	3µl	2µl	-	(-)

Για κάθε εξεταζόμενη ουσία ή εκχύλισμα χρησιμοποιείται ένα αρνητικό control (1µg πλασμίδιο), ένα θετικό control (1µg πλασμίδιο + 40mM H_2O_2 -UV) και ένα control της εξεταζόμενης ουσίας στην μεγαλύτερη συγκέντρωση ώστε να παρατηρηθεί τυχόν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA.

Τα δείγματα αναδεύονταν (spin-vortex-spin) και τοποθετούνταν κάτω από 300W λάμπα UV (Osram) σε απόσταση 52cm για 3 min ακριβώς. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 µl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης 0,8% στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5µg/ml) για 30

min και ξεβαφόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

2.2.2.1iii Στατιστικά ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών OH^\bullet , που παράγονται από την φωτόλυση με UV ακτινοβολία του H_2O_2 αλλά και η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO^\bullet , που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S) / (S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

όπου S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control, S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 40mM H_2O_2 και UV ακτινοβολία ή DNA + 2,5mM AAPH) και S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα 40mM H_2O_2 και UV ακτινοβολία ή 2,5mM AAPH.

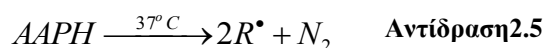
Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

2.2.2.2 Επαγόμενη από ρίζες ROO• πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων στο DNA

2.2.2.2i Αρχή της μεθόδου

Οι ρίζες ROO• είναι από τις πιο συνηθισμένες ρίζες που παράγονται μέσα στον οργανισμό, αποτελώντας έναν από τους σημαντικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην έναρξη της αλληλουχίας αντιδράσεων της οξειδωσης των λιπιδίων. Η χημεία των ριζών αυτών ποικίλει ανάλογα με την ομάδα R- που τις απαρτίζουν καθώς και το περιβάλλον στο οποίο παράγονται.

Ως πηγή παραγωγής ριζών ROO• χρησιμοποιείται το AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropane hydrochloride). Το AAPH σε θερμοκρασία 37°C διασπάται και οδηγεί στην παραγωγή ριζών ROO• (Αντιδράσεις 2.5,2.6).



Εκτός από την ιδιότητα των ριζών ROO• να ξεκινούν την λιπιδική υπεροξειδωση έχουν την ικανότητα να προκαλούν μονόκλωνα σπασίματα στο DNA. Η δράση αυτή στο πλασμιδιακό DNA έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του από υπερελικωμένο, σε ανοιχτό κυκλικό και γραμμικό. Έτσι η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής δράσης γίνεται μέσω της αναστολής της μετατροπής της υπερελικωμένης διαμόρφωσης του πλασμιδίου στην ανοιχτή κυκλική ή γραμμική.

Η παρεμπόδιση της αλλαγής αυτής στην διαμόρφωση του πλασμιδιακού DNA από το εξεταζόμενο φυτικό εκχύλισμα ή την περιεχόμενη δραστική ουσία αντικατοπτρίζει την προστατευτική δράση των μορίων αυτών απέναντι στην δράση των ριζών ROO•.

2.2.2.2ii Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται το gel αгарόζης περιεκτικότητας 0,8 %, με διάλυση 0,72 gr αгарόζης σε 90 ml TBE 1x (10mM Tris-Cl, Boric Acid, 0,5M EDTA), και απόχυσή του στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης.

Στη συνέχεια γίνεται η προετοιμασία των διαλυμάτων αντίδρασης ως εξής:

- **PBS** (pH=7,4) : NaCl 137mM (8gr/1000ml), KCl 2,7mM (0,2gr/1000 ml), Na₂HPO₄ 8,1mM (1,44gr/1000ml), KH₂PO₄ 1,5mM (0,2gr/1000ml). Το διάλυμα αποστειρώνεται και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου.
- **AAPH 100mM**: 13,56mg AAPH σε 500μl PBS. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.
- **AAPH 2,5mM**: Αραιώνεται το διάλυμα AAPH 100mM 16 φορές. Το διάλυμα προετοιμάζεται πριν από την πραγματοποίηση της αντίδρασης και διατηρείται στον πάγο.

Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε συγκεντρώσεις 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 μg/ml με εξαίρεση το B9 σε συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6, 8 μg/ml.

Τα συστατικά της αντίδρασης (10μl) ήταν τα εξής: PBS, DNA Bluescript plasmid 3,2μg, AAPH 2,5mM και το εξεταζόμενο εκχύλισμα για τον έλεγχο της αντιοξειδωτικής του δράσης, στις παραπάνω συγκεντρώσεις.

Η αντίδραση πραγματοποιείται με την προσθήκη των υλικών με την σειρά που βρίσκονται στον Πίνακα 2.7.

Πίνακας 2.7: Ποσότητες αντιδραστηρίων.

	PBS	αντιοξειδωτικός παράγοντας	DNA plasmid	AAPH
Control	8μl	-	2μl	-
AAPH 2.5mM	4μl	-	2μl	4μl
Εκχ. (0.25 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (0.5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (1 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (1,5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (2 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl
Εκχ. (2,5 μg/ml)	1μl	3μl	2μl	4μl

Τα δείγματα τοποθετούνταν στο σκοτάδι στους 37°C για 45 min. Στη συνέχεια η αντίδραση τερματιζόταν με την προσθήκη 3 μl Loading Buffer (Χρωστική Bromophenol Blue 0.25% + 30% Glycerol) και η ανάλυση γινόταν με ηλεκτροφόρηση σε gel αгарόζης στα 70 V για 1h. Στη συνέχεια το gel βαφόταν σε 250ml διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου (0,5μg/ml) για 30 min και ξεβαφόταν σε 250ml απιονισμένο νερό για 30 min. Τελικά το gel φωτογραφιζόταν κάτω από UV. Κάθε πείραμα γινόταν εις τριπλούν.

2.2.2.2iii Στατιστικά ανάλυση

Η αναστολή της τοξικής δράσης των ριζών ROO[•], που παράγονται από την θερμική αποικοδόμηση του AAPH υπολογίστηκαν ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = [(S_0 - S)/(S_{\text{control}} - S_0)] \cdot 100$$

όπου S_{control} το ποσοστό υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου στο αρνητικό control, S_0 το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής πλασμιδίου του θετικού control (DNA + 2,5mM AAPH) και S το ποσοστό της υπερελικωμένης μορφής του πλασμιδίου παρουσία του προς εξέταση αντιοξειδωτικού παράγοντα (εκχύλισμα) καθώς και του οξειδωτικού παράγοντα (2,5mM AAPH).

Από τα τρία ποσοστά αναστολής για κάθε εκχύλισμα βρέθηκε η μέση τιμή (\bar{x}) καθώς και το τυπικό σφάλμα (SE) για το καθένα. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS και συγκεκριμένα μέσω ανάλυσης διακύμανσης δύο παραγόντων (ANOVA). Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του test του Dunnet.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH .

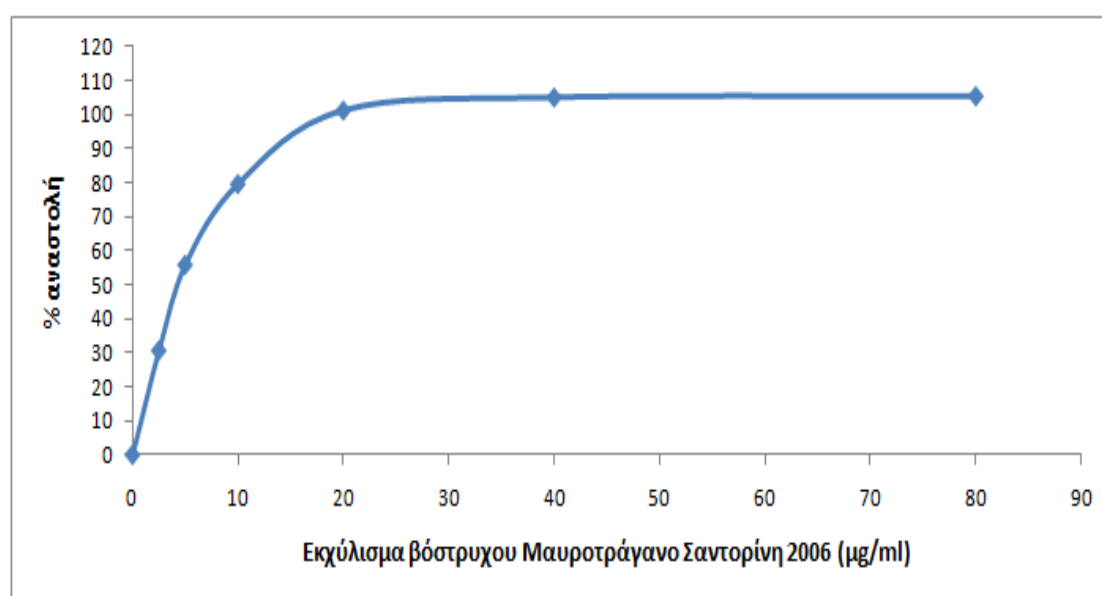
Συνολικά μελετήθηκαν 24 εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε 6 συγκεντρώσεις από 2,5-160μg/ml. Τα εκχυλίσματα μείωσαν δόσοεξαρτώμενα την απορρόφηση του διαλύματος DPPH στα 517nm γεγονός που δείχνει σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα DPPH[•], δηλαδή αντιοξειδωτική ικανότητα. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 3.1 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀ τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC₅₀ κυμαίνονται από 3μg/ml έως 15μg/ml (Γράφημα 3.1).

Τα πιο ισχυρά ήταν δύο εκχυλίσματα γίγαρτων με πρώτο της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 (Διάγραμμα 3.1.21) και δεύτερο της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 (Διάγραμμα 3.1.19). Το ισχυρότερο εκχύλισμα βοστρύχου ήταν αυτό της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006 με IC₅₀ ίσο με 4,2μg/ml (Διάγραμμα

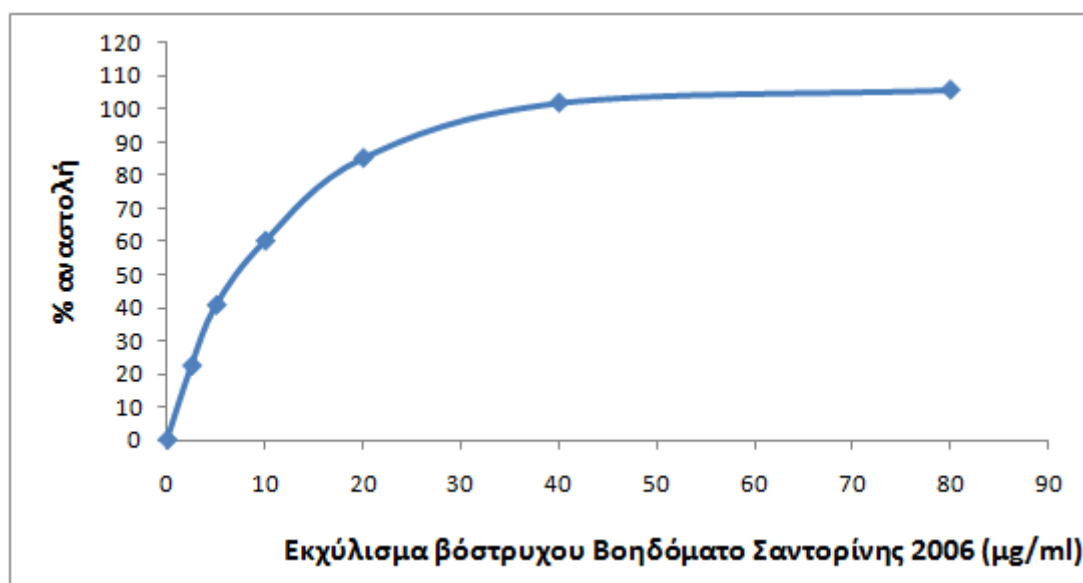
3.1.1). Το ασθενέστερα εκχυλίσματα ήταν αυτά που προέκυψαν από τους βόστρυχους της ποικιλίας Αθήρι Σαντορίνης 2007 και Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008, όπως και το εκχύλισμα του Grape seed με τιμές IC_{50} μεγαλύτερες από 13 $\mu\text{g/ml}$ (Διαγράμματα 3.1.14, 3.1.15, 3.1.24).

Το μεγαλύτερο ποσοστό εκχυλισμάτων και συγκεκριμένα 19 από τα 24 δείγματα που μελετήθηκαν παρουσίασαν IC_{50} μεταξύ των τιμών 4 $\mu\text{g/ml}$ και 10 $\mu\text{g/ml}$ (Γράφημα 3.1).

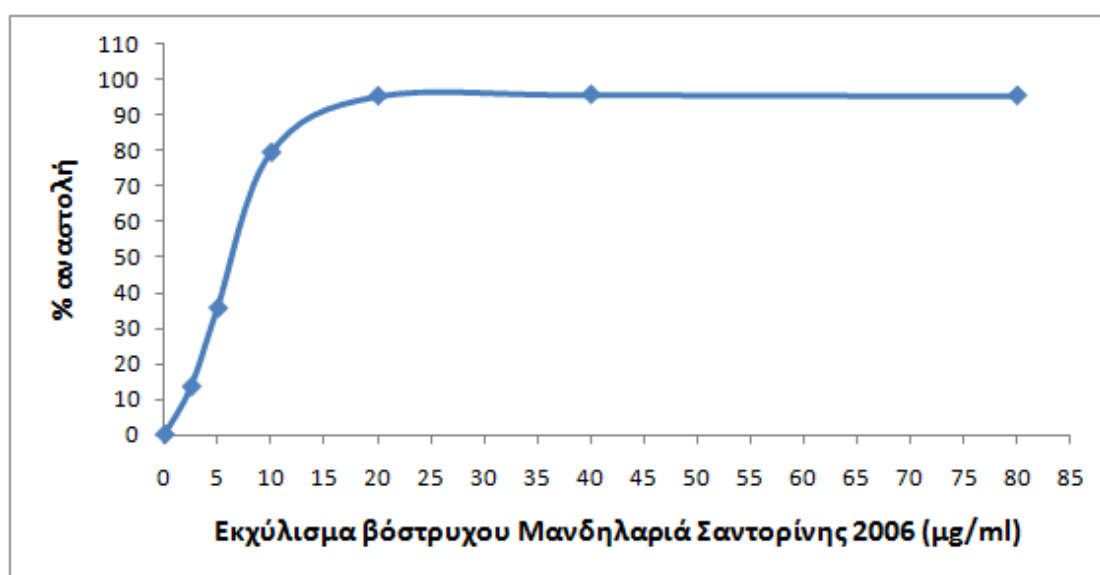
Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 517nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.



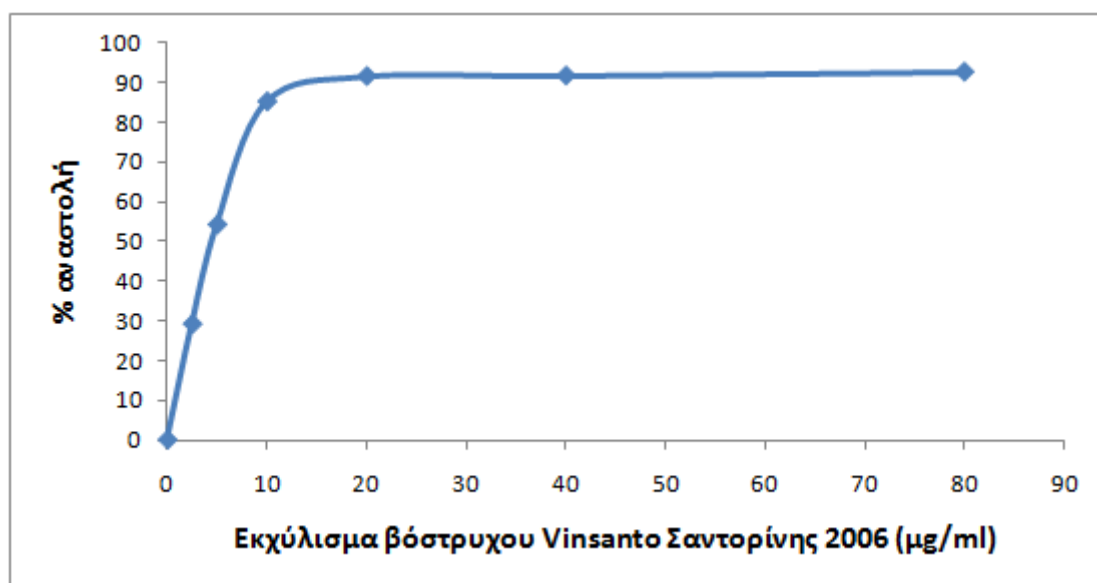
Διάγραμμα 3.1.1 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006.



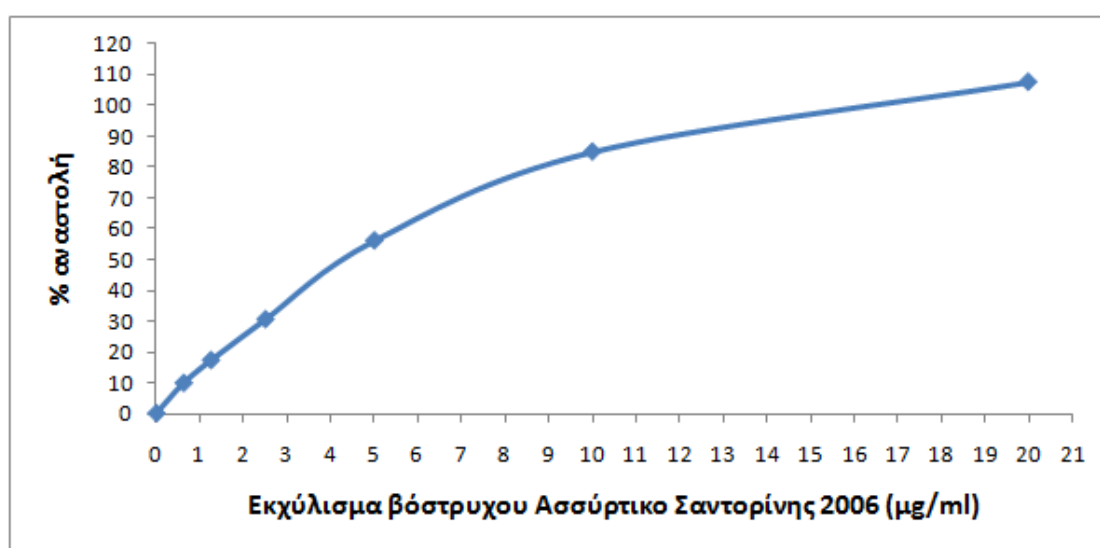
Διάγραμμα 3.1.2 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βοηδόματο Σαντορίνης 2006.



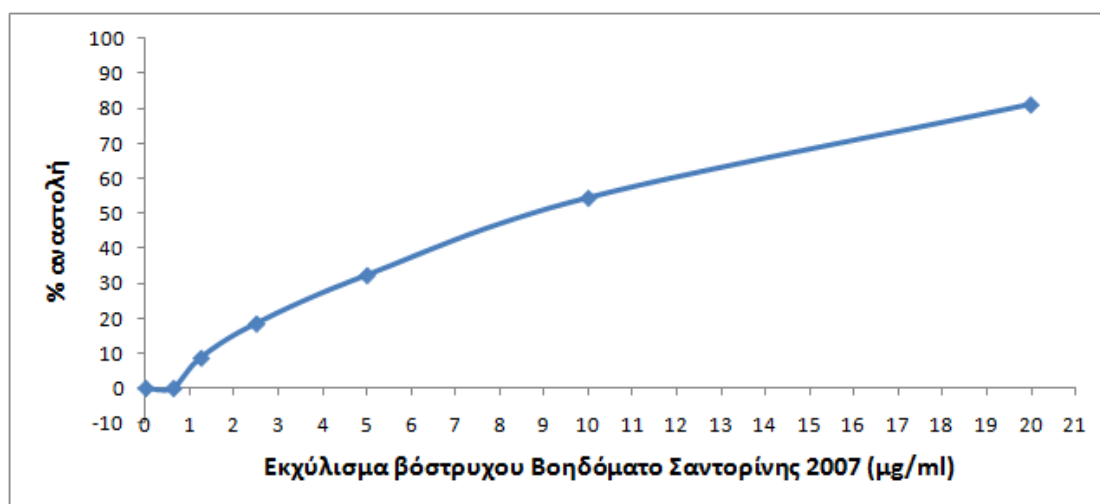
Διάγραμμα 3.1.3 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006.



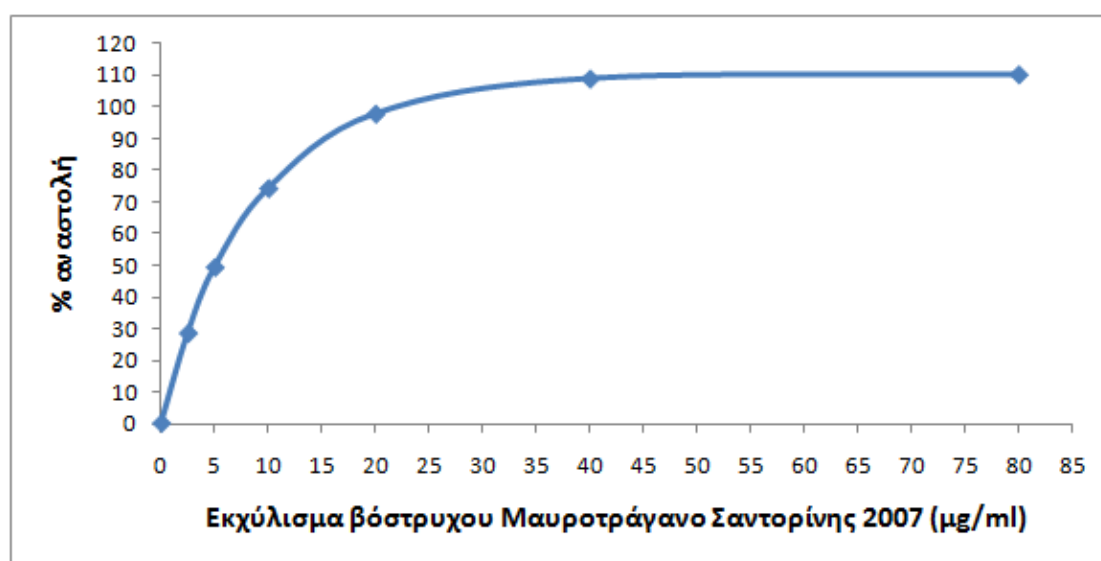
Διάγραμμα 3.1.4 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Vinsanto Σαντορίνης 2006.



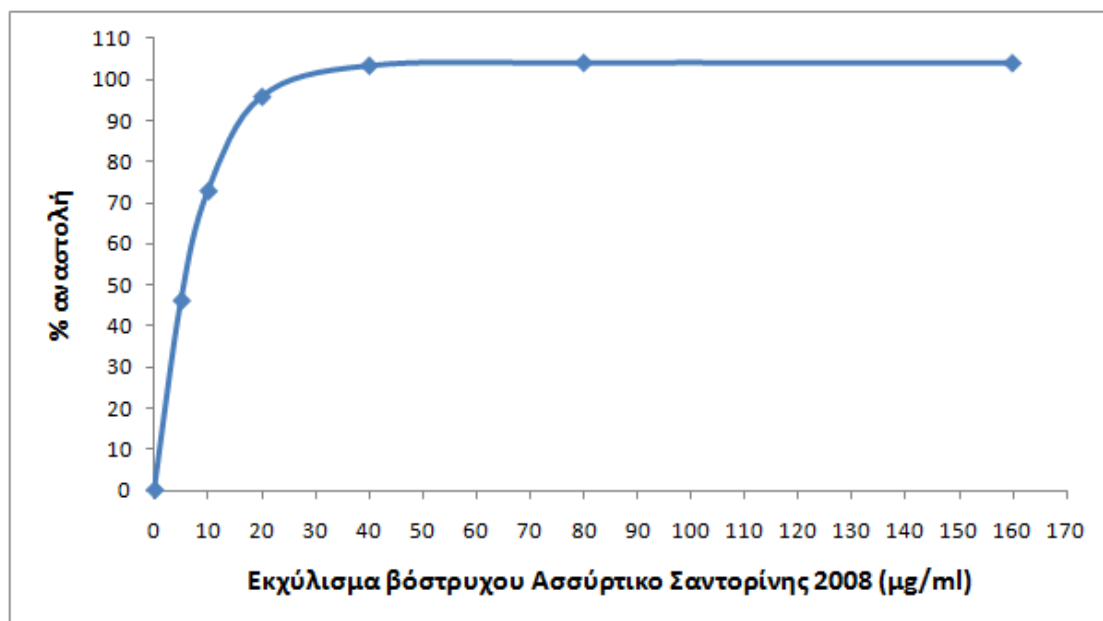
Διάγραμμα 3.1.5 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2006.



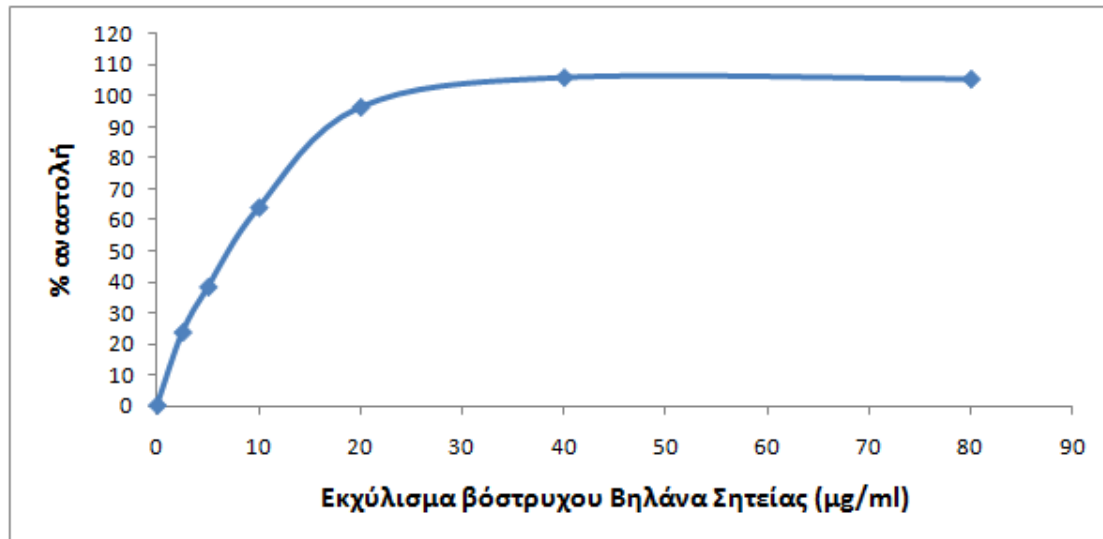
Διάγραμμα 3.1.6 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βοηδόματο Σαντορίνης 2007.



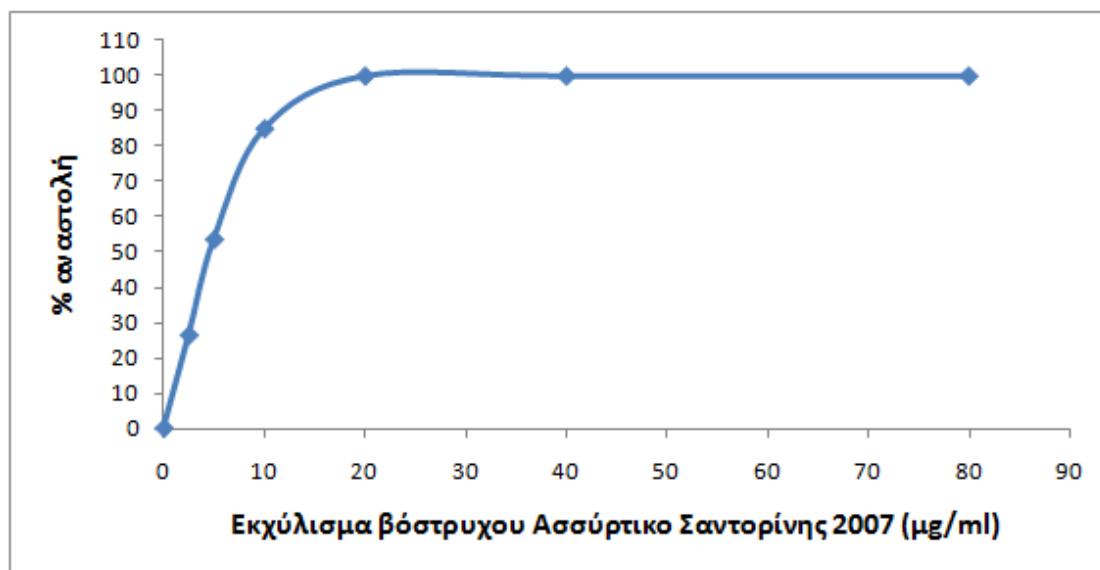
Διάγραμμα 3.1.7 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007.



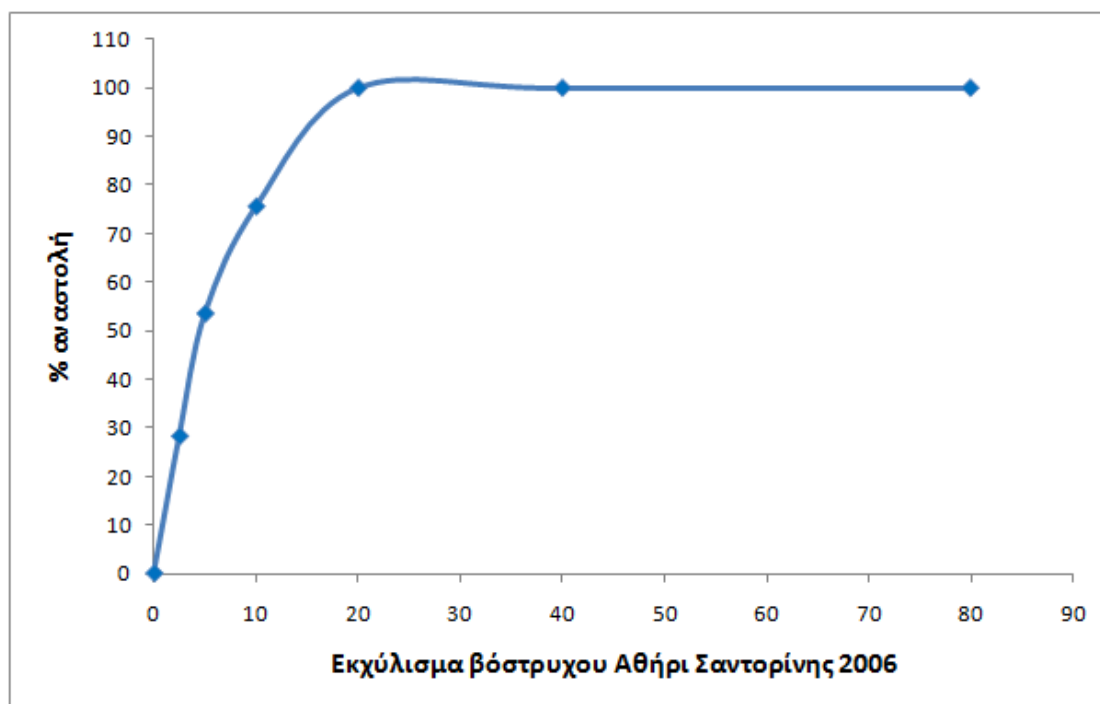
Διάγραμμα 3.1.8 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008.



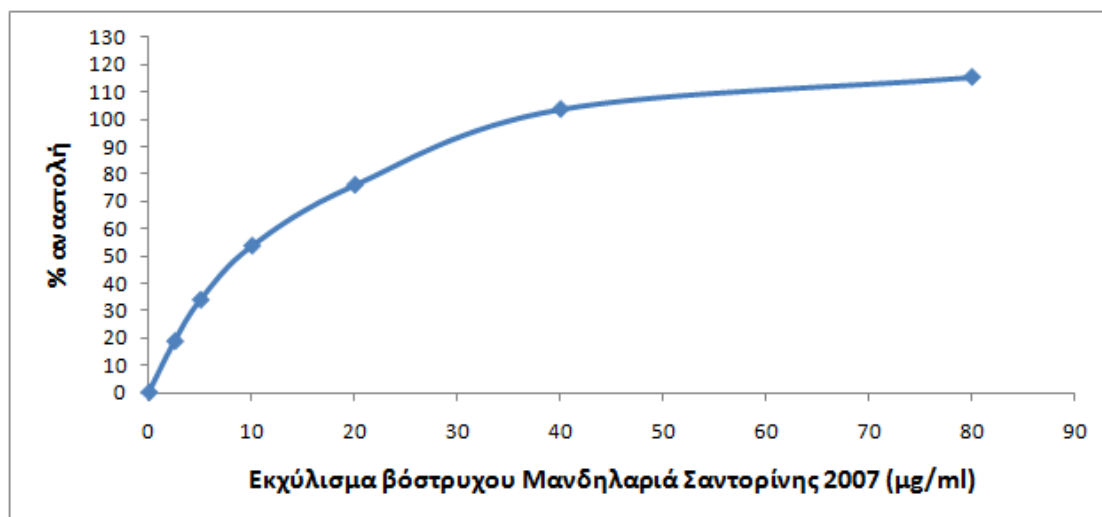
Διάγραμμα 3.1.9 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βηλάνια Σητείας.



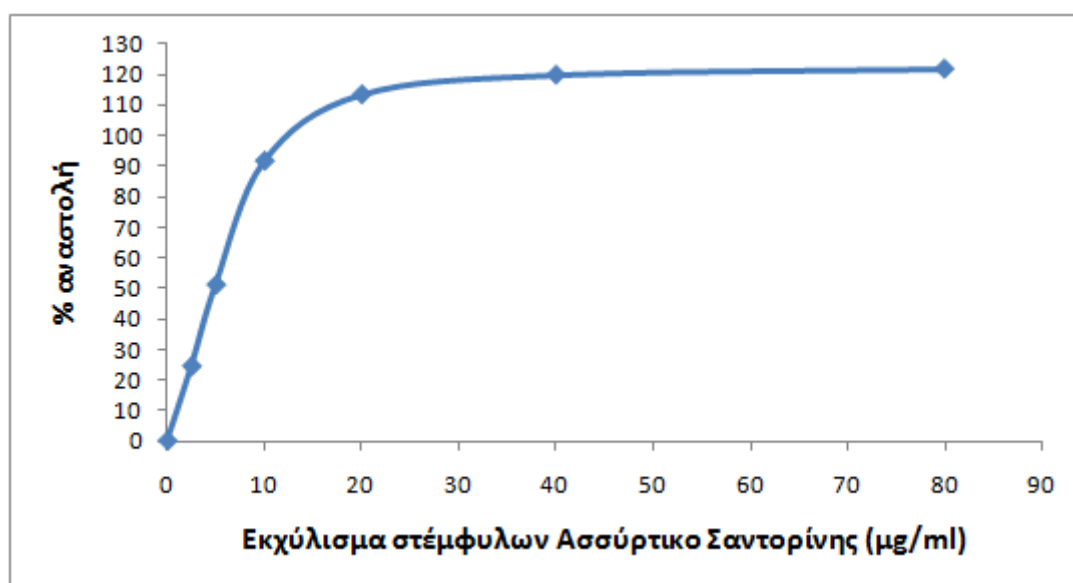
Διάγραμμα 3.1.10 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασσούρτικο Σαντορίνης 2007.



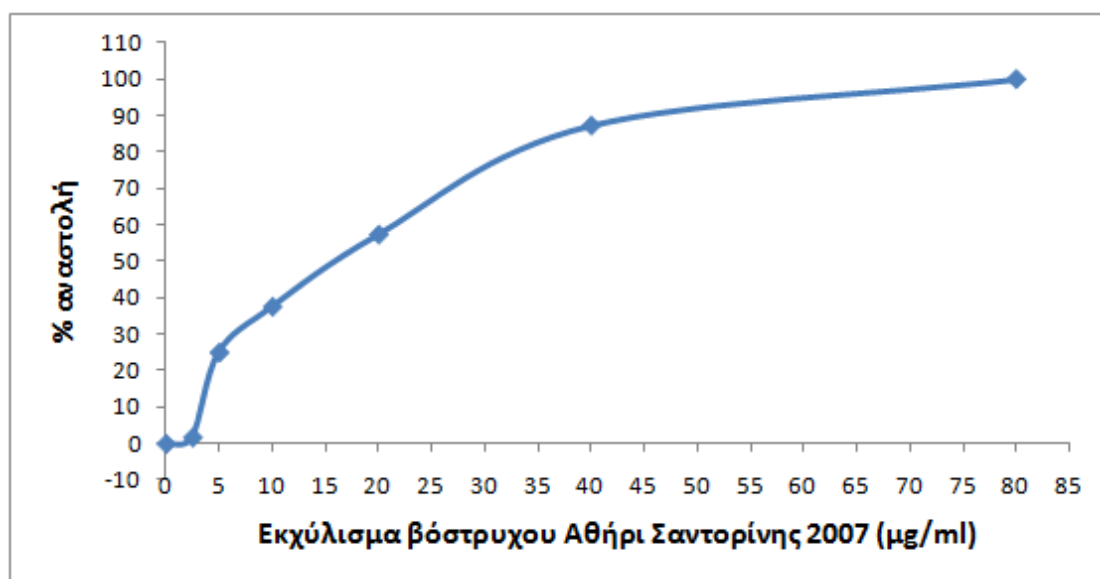
Διάγραμμα 3.1.11 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Αθήρι Σαντορίνης 2006.



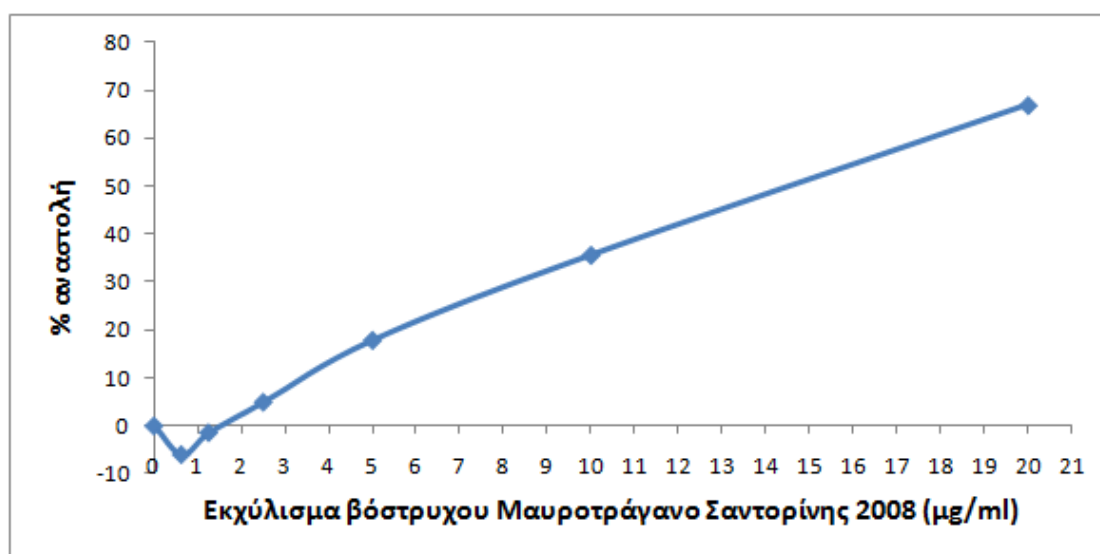
Διάγραμμα 3.1.12 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007.



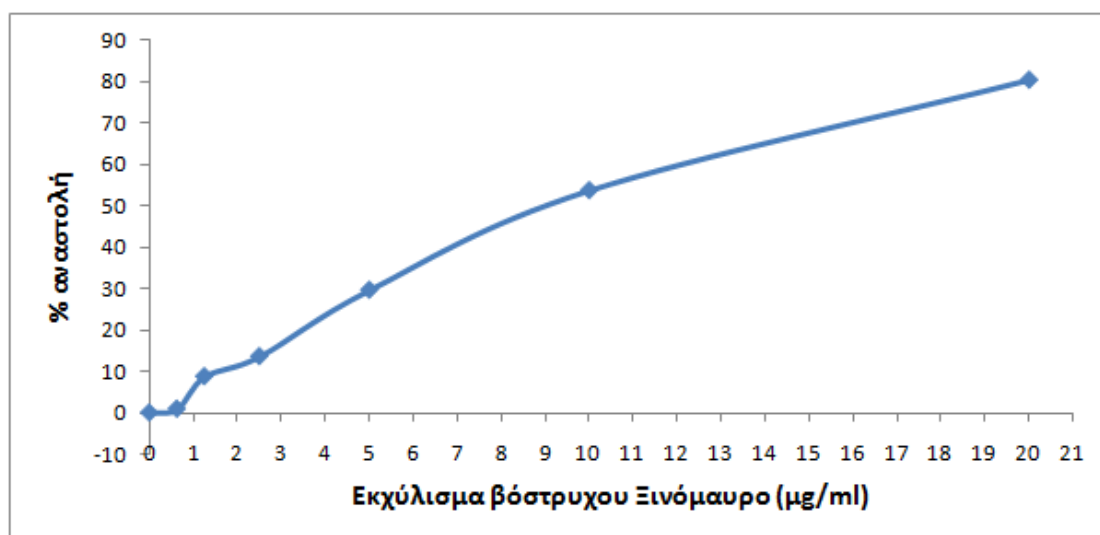
Διάγραμμα 3.1.13 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα στέμφυλων της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2007.



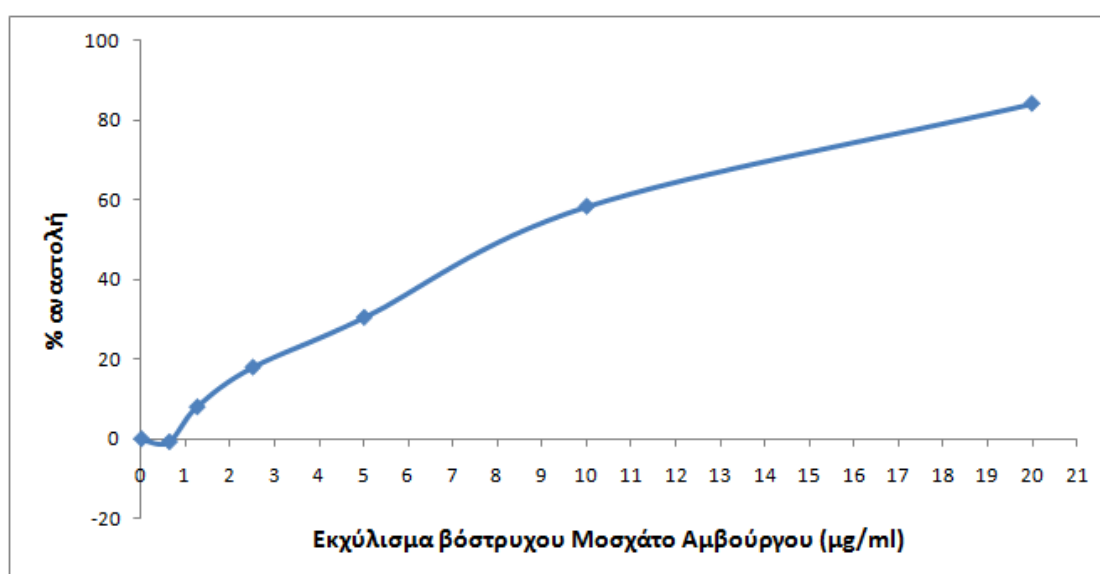
Διάγραμμα 3.1.14 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Αθήρι Σαντορίνης 2007.



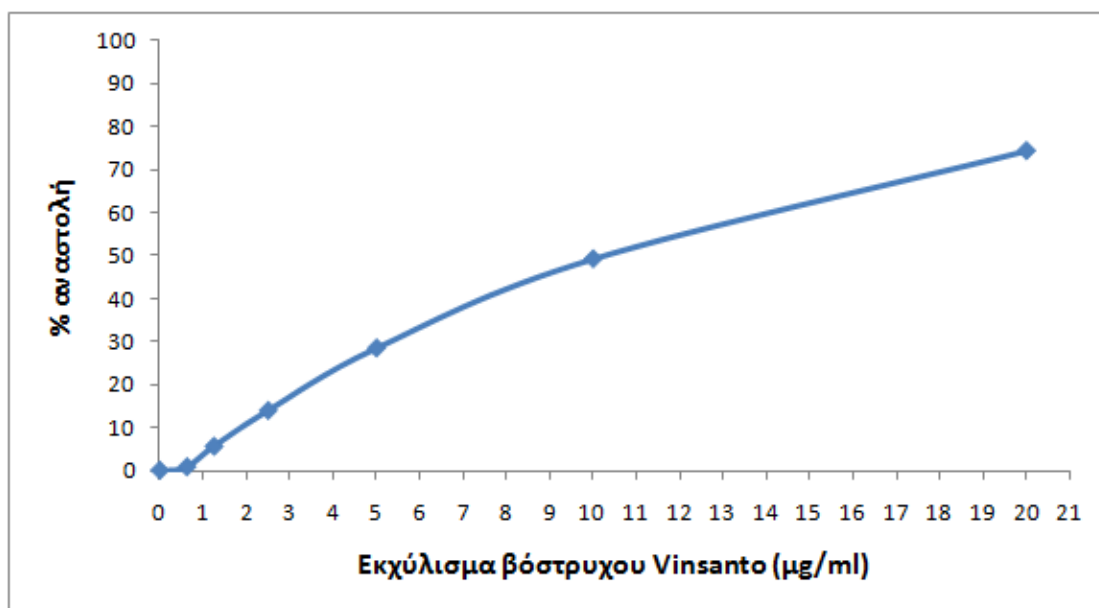
Διάγραμμα 3.1.15 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008.



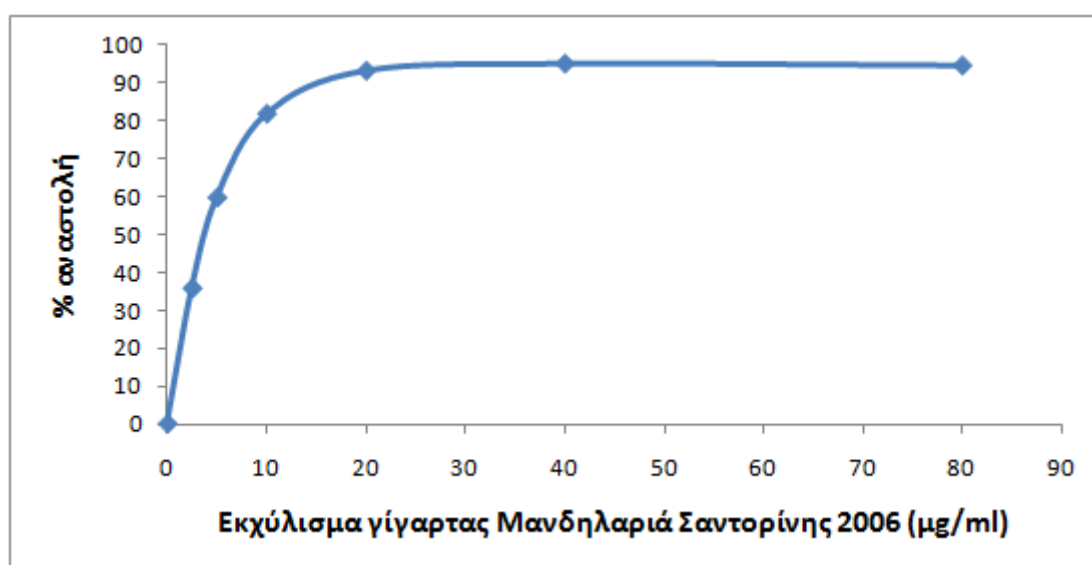
Διάγραμμα 3.1.16 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ξινόμαυρο.



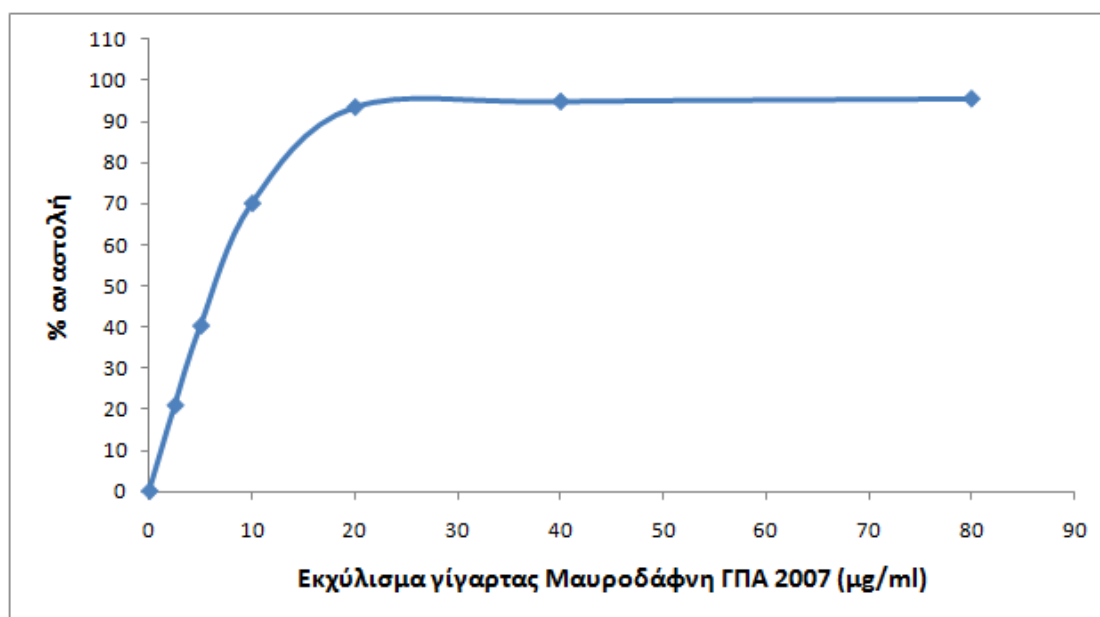
Διάγραμμα 3.1.17 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μοσχάτο Αμβούργου.



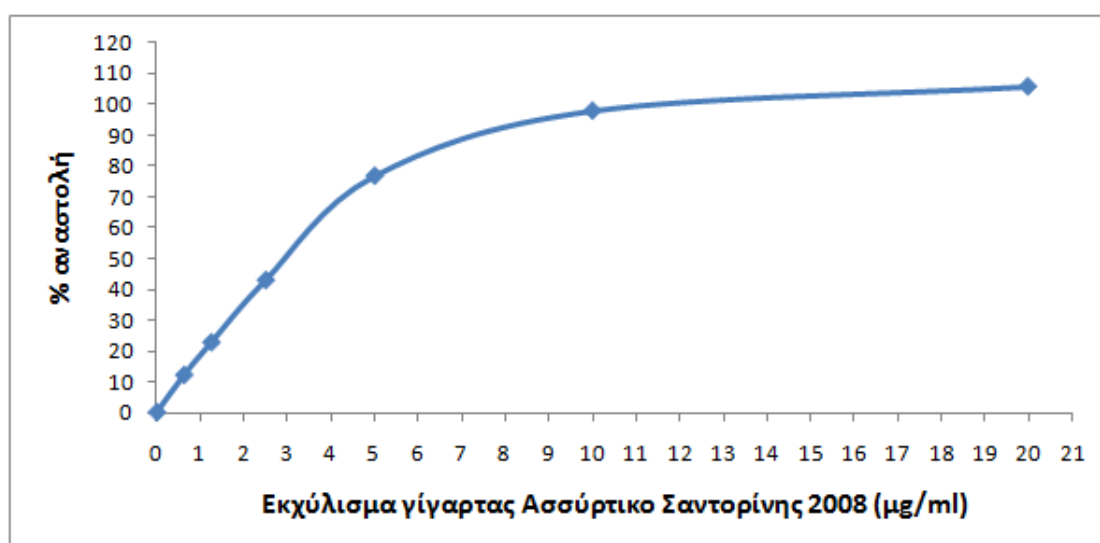
Διάγραμμα 3.1.18 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Vinsanto.



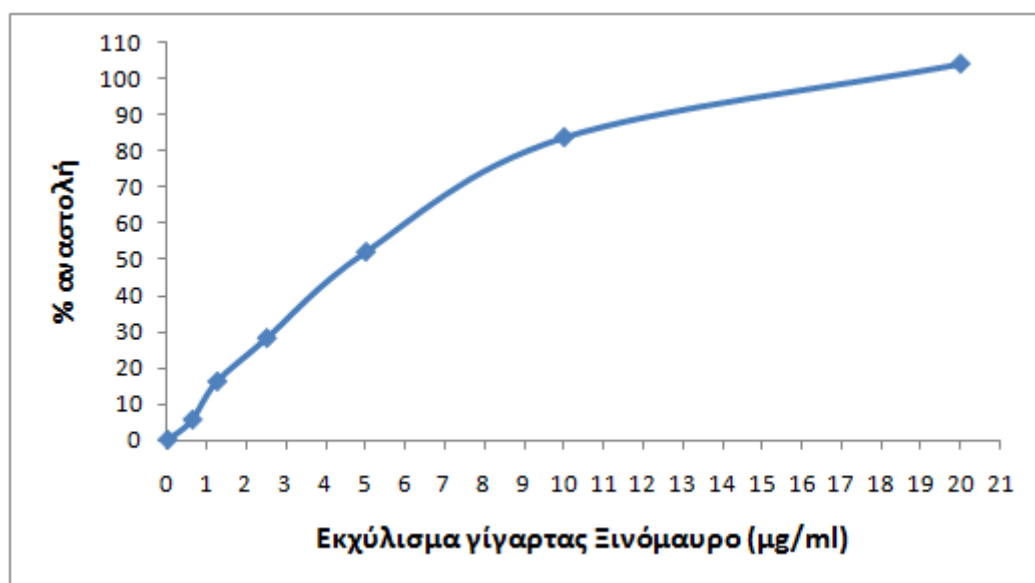
Διάγραμμα 3.1.19 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006.



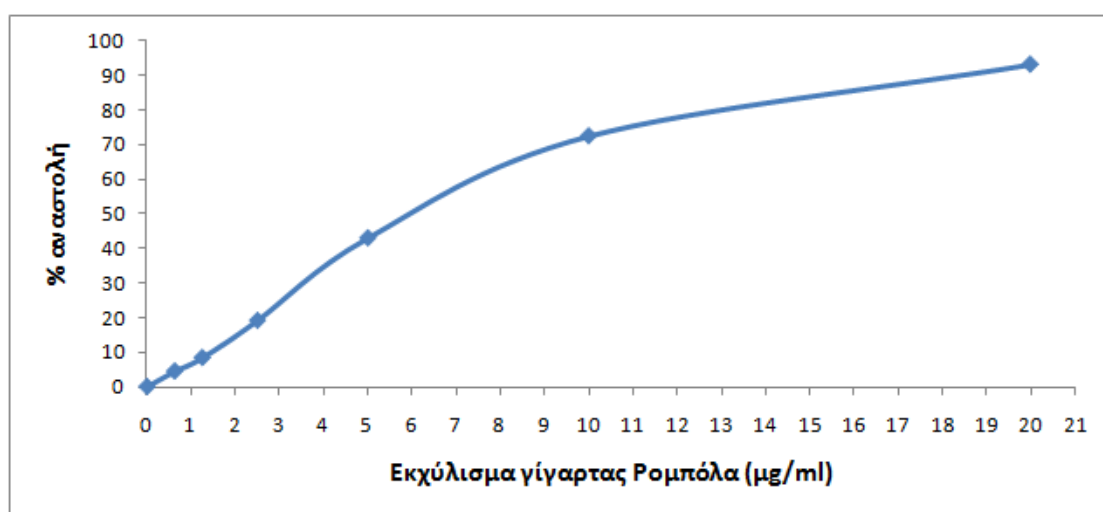
Διάγραμμα 3.1.20 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Μαυροδάφνη ΓΠΑ 2007.



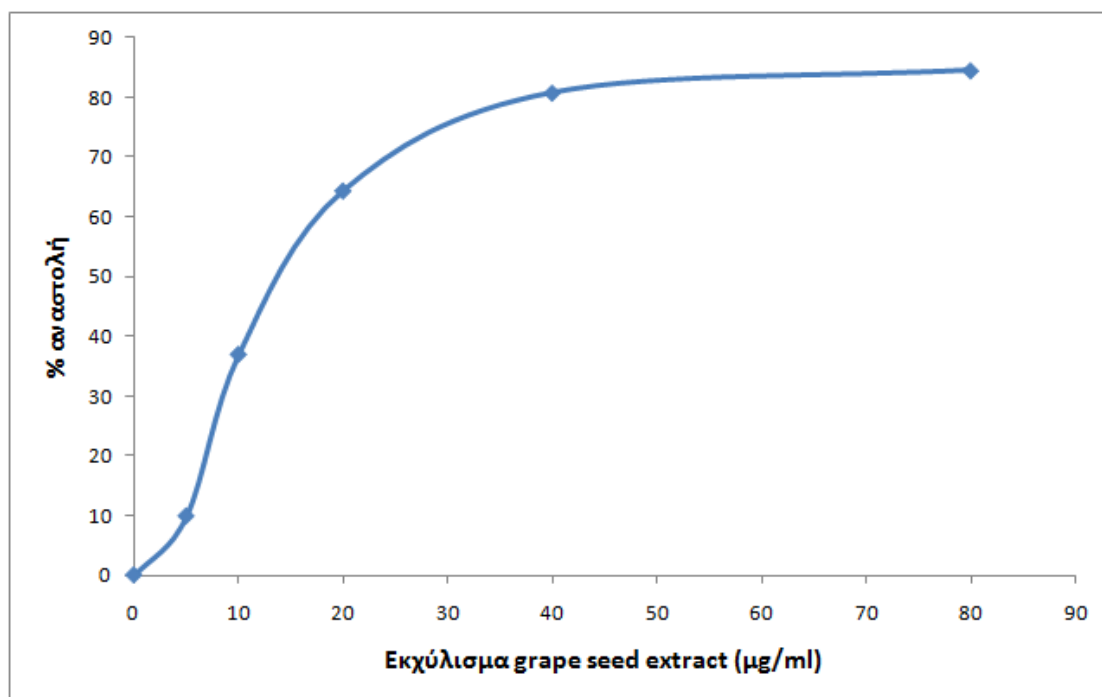
Διάγραμμα 3.1.21 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2008.



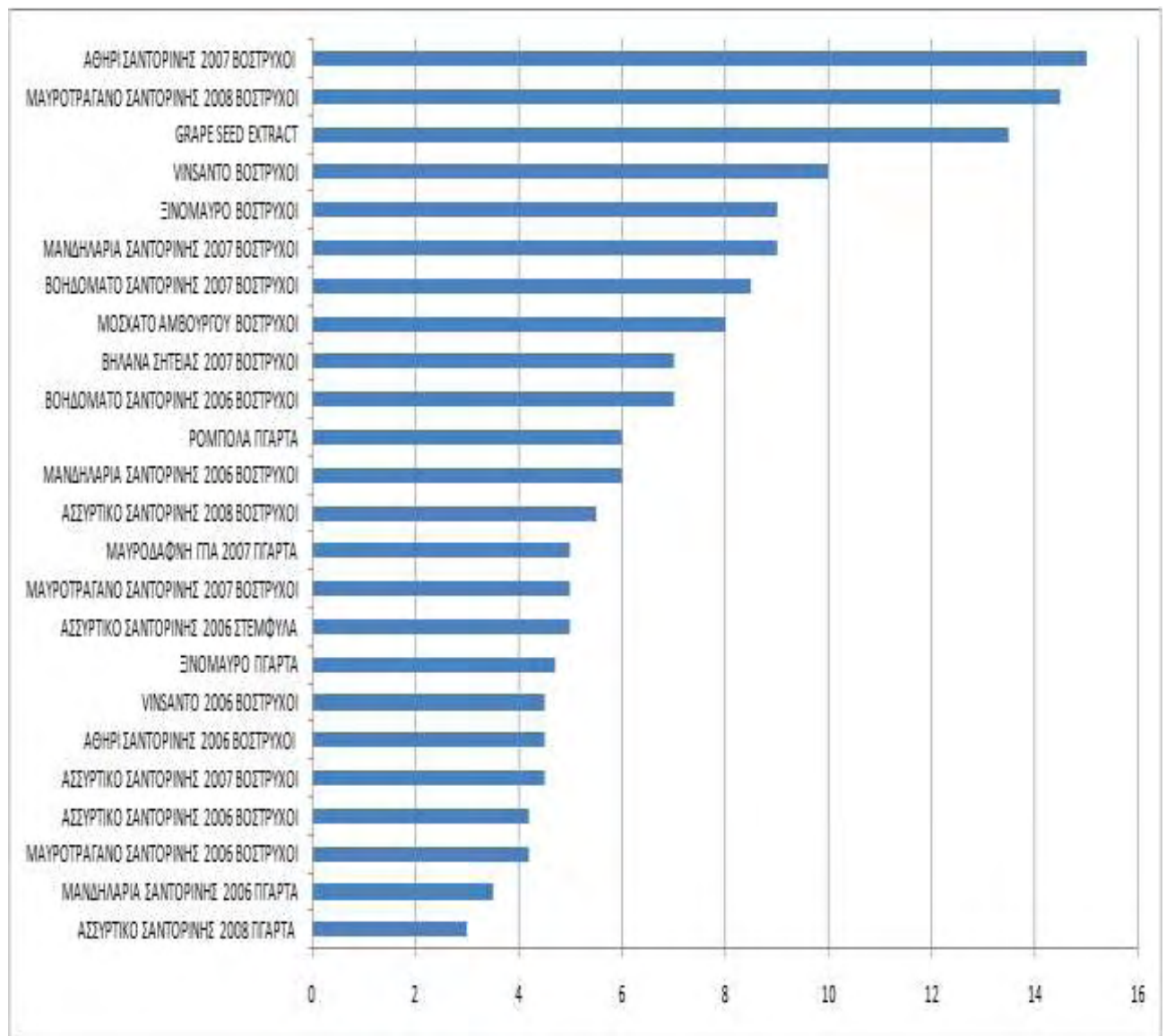
Διάγραμμα 3.1.22 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ξινόμαυρο.



Διάγραμμα 3.1.23 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ρομπόλα.



Διάγραμμα 3.1.24 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας DPPH από το εκχύλισμα Grape Seed.



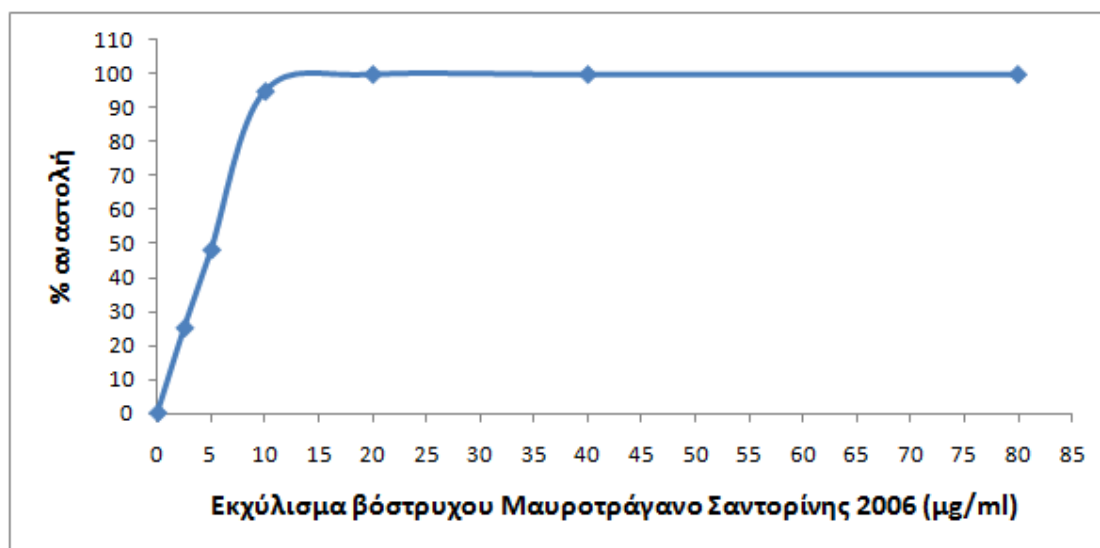
Γράφημα 3.1 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου για την αλληλεπίδραση με την ρίζα DPPH .

3.2 Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου μέσω αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS⁺ .

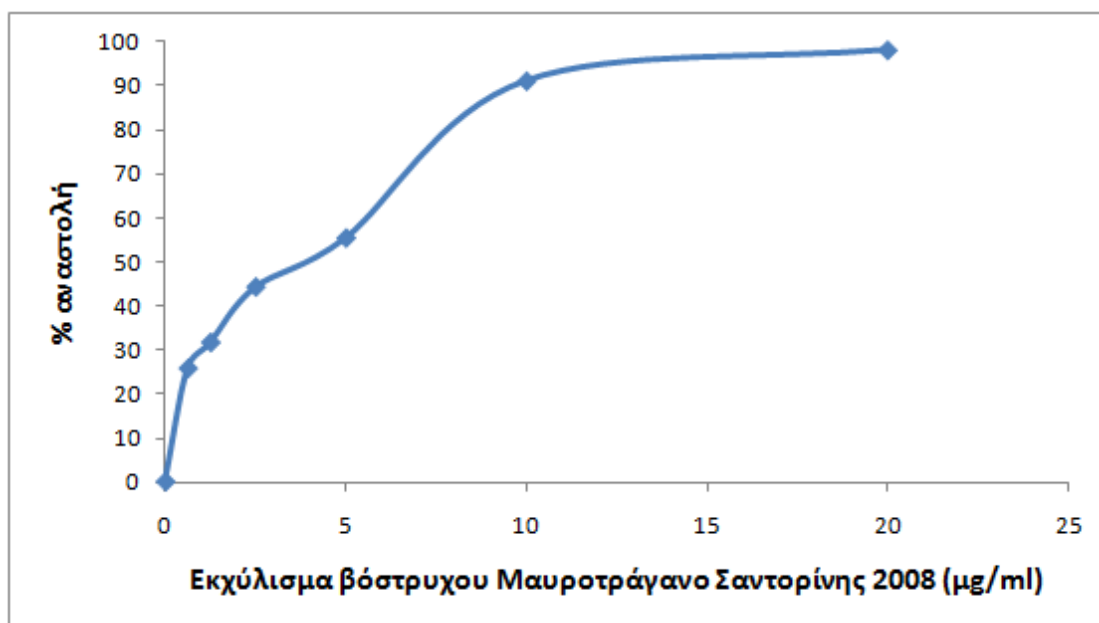
Μελετήθηκαν συνολικά 24 εκχυλίσματα από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου και εξετάστηκε η αντιοξειδωτική τους δράση σε συγκεντρώσεις 2.5, 5, 10, 20, 40, 80μg/ml. Τα περισσότερα εκχυλίσματα παρουσίασαν σημαντική ικανότητα αλληλεπίδρασης με τη ρίζα ABTS⁺⁺. Οι τιμές IC₅₀ όλων των εκχυλισμάτων φαίνονται στο γράφημα 3.2 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC₅₀

τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από γίγαρτα ήταν ιδιαίτερα ισχυρά παρουσιάζοντας μεγάλη αντιοξειδωτική ικανότητα με τιμές IC_{50} μεταξύ 2μg/ml και 5,5μg/ml(γράφημα 3.2). Το πιο ισχυρό εκχύλισμα βόστρυχου ήταν της Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2007(διάγραμμα 3.2.10) με IC_{50} ίσο με 3μg/ml, κοντά στις τιμές, ενώ επίσης μεγάλη αντιοξειδωτική δράση παρουσίασαν τα εκχυλίσματα βόστρυχου από Ασσύρτικο Σαντορίνης 2007, Vinsanto 2007, Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007, Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008, Βοηδόματο Σαντορίνης 2006, Μοσχάτο Αμβούργου με IC_{50} ίσο με 3,5μg/ml (διαγράμματα 3.2.9,3.2.13,3.2.7,3.2.8,3.2.3,3.2.14) Το εύρος των τιμών IC_{50} κυμάνθηκε από 2μg/ml έως 11,8μg/ml (Γράφημα 3.2).

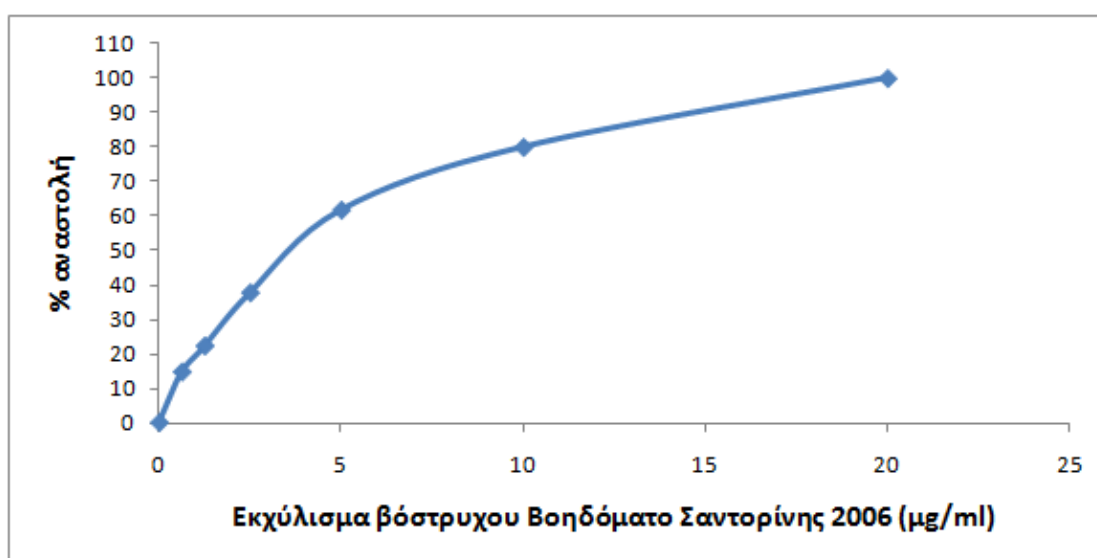
Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασαν οποιαδήποτε απορρόφηση στα 730nm, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στις αντίστοιχες συγκεντρώσεις.



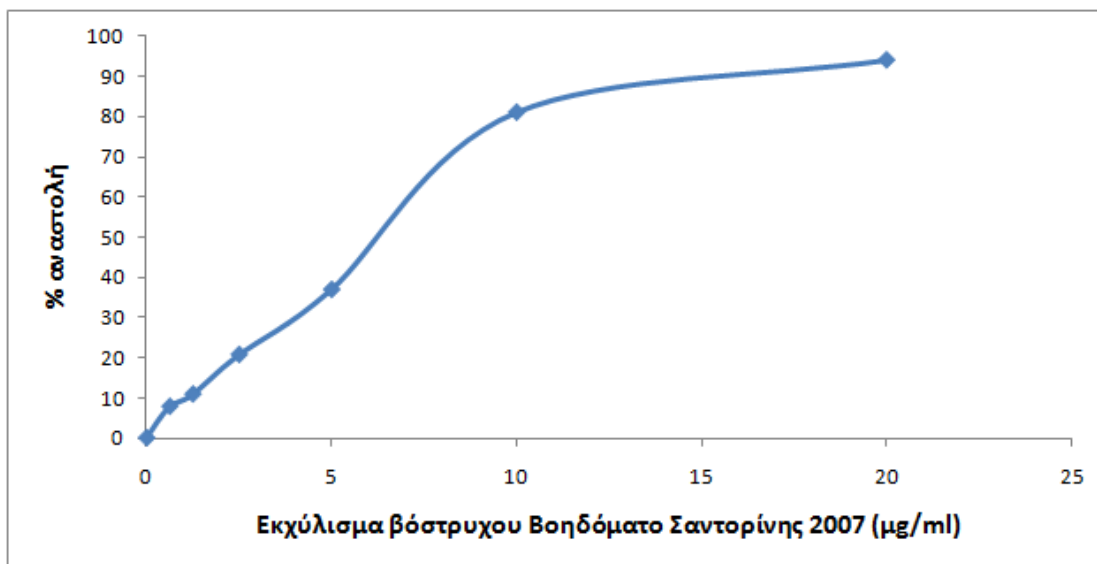
Διάγραμμα 3.2.1 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006.



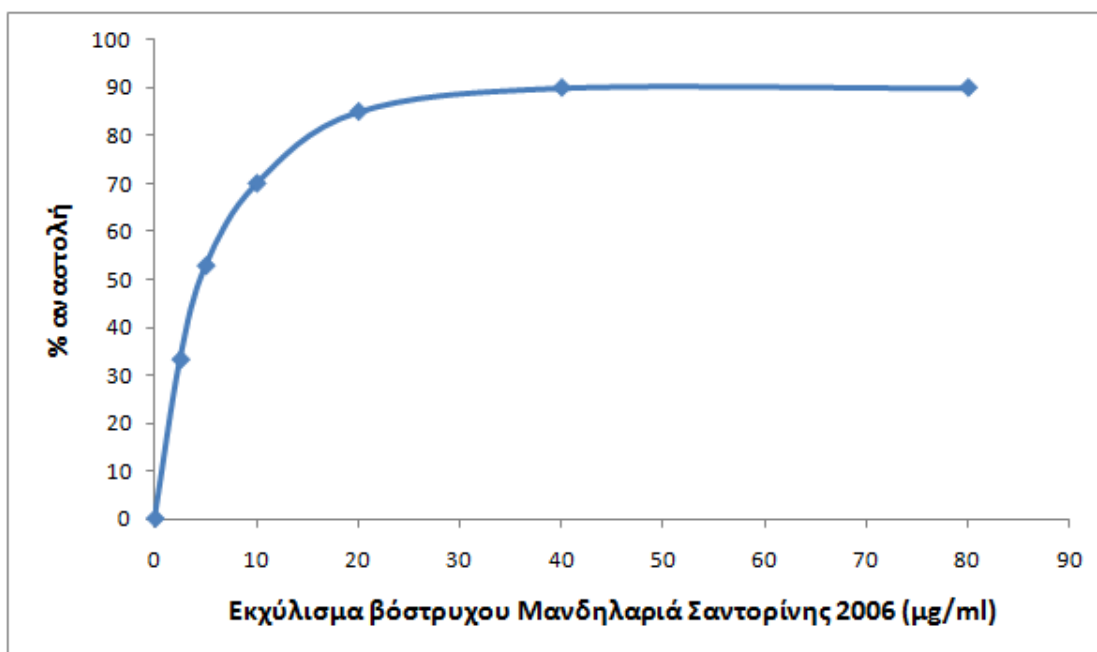
Διάγραμμα 3.2.2 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008.



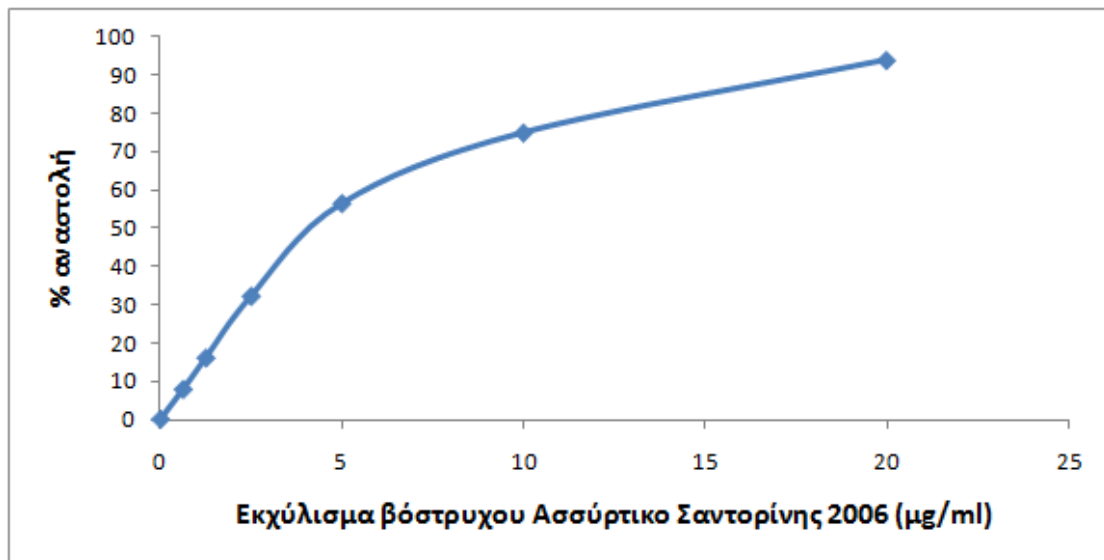
Διάγραμμα 3.2.3 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βοηδόματο Σαντορίνης 2006.



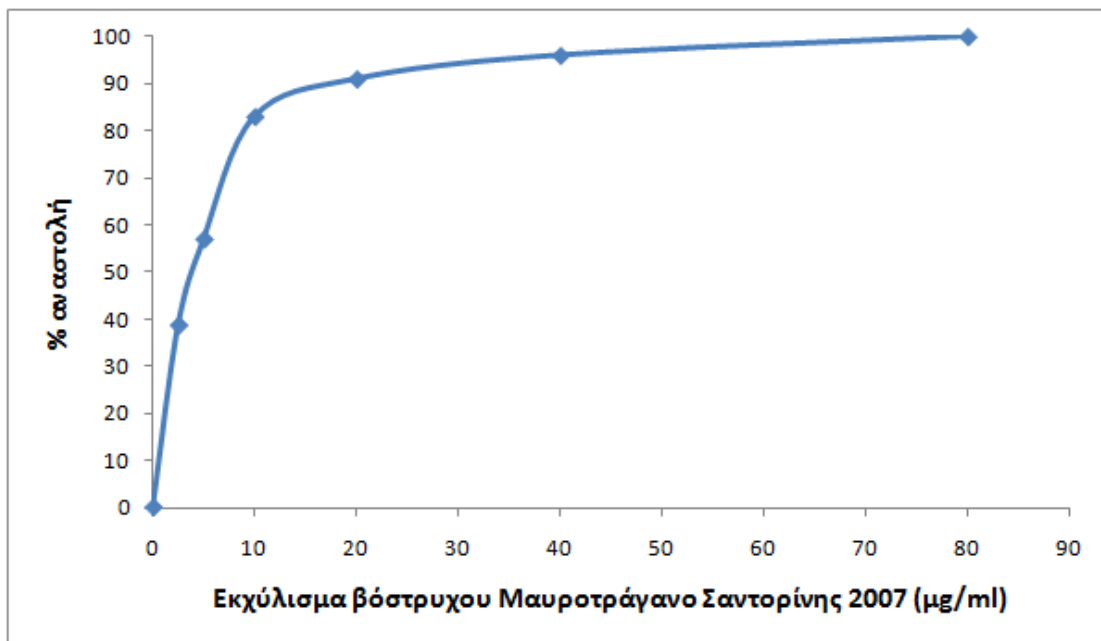
Διάγραμμα 3.2.4 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βοηδόματο Σαντορίνης 2007.



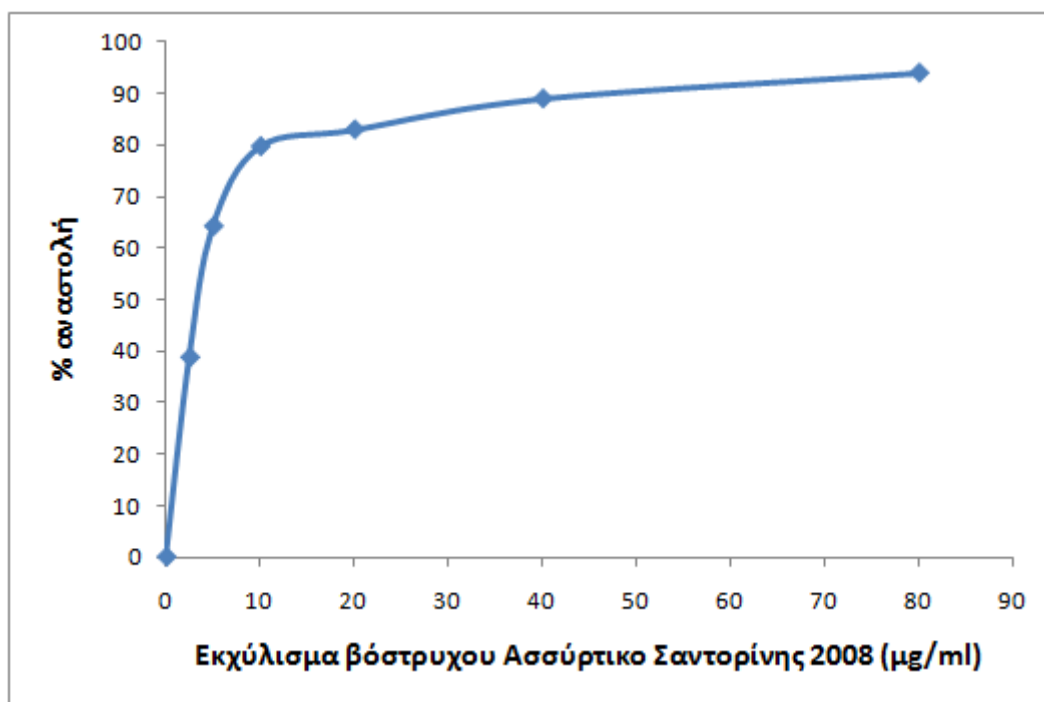
Διάγραμμα 3.2.5 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006.



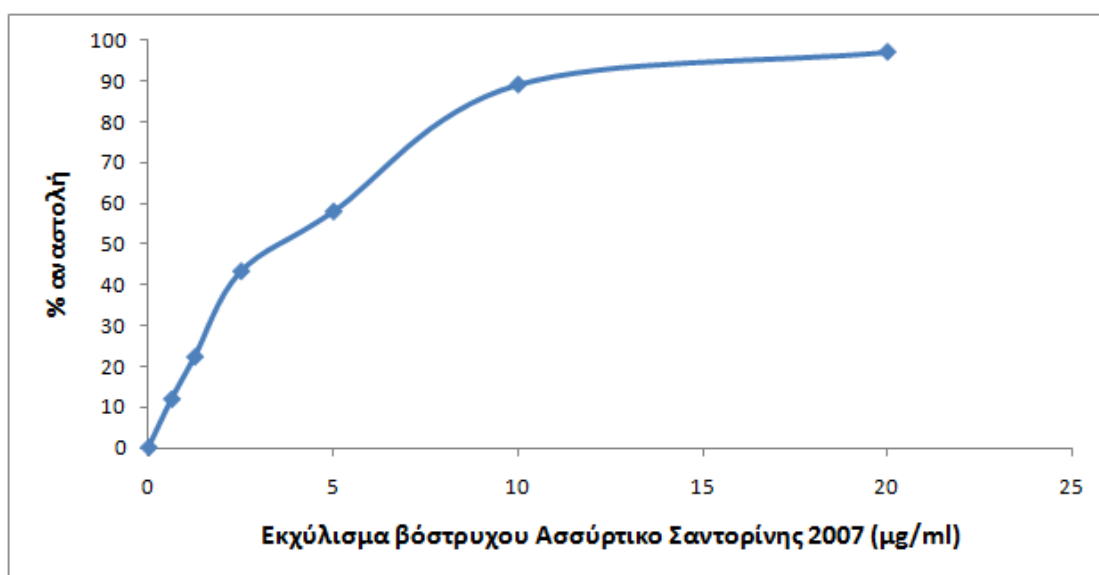
Διάγραμμα 3.2.6 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2006.



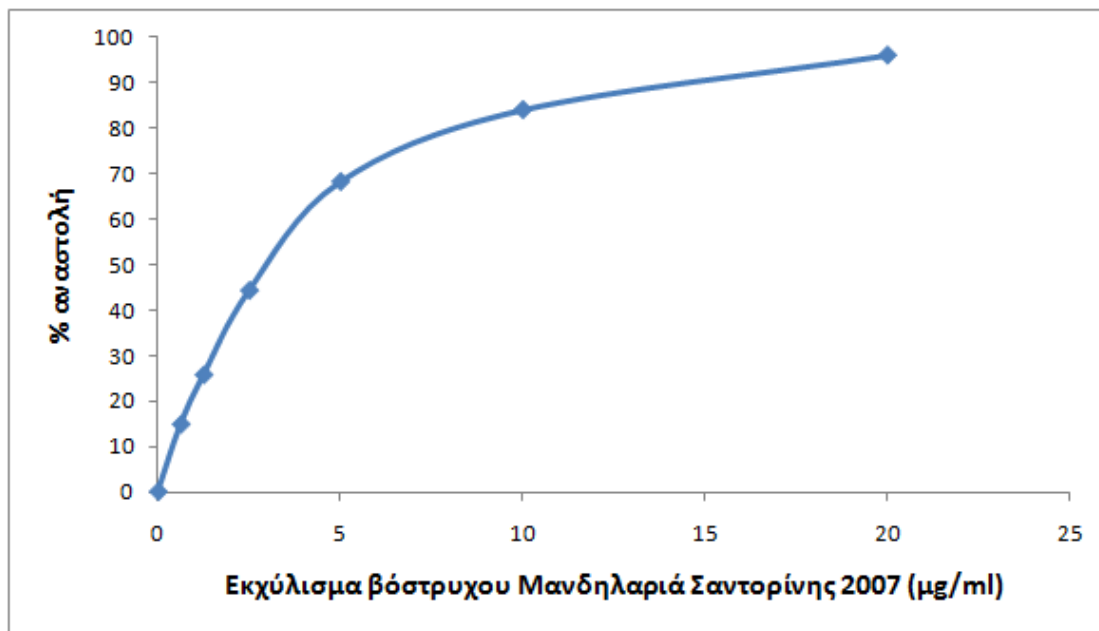
Διάγραμμα 3.2.7 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007.



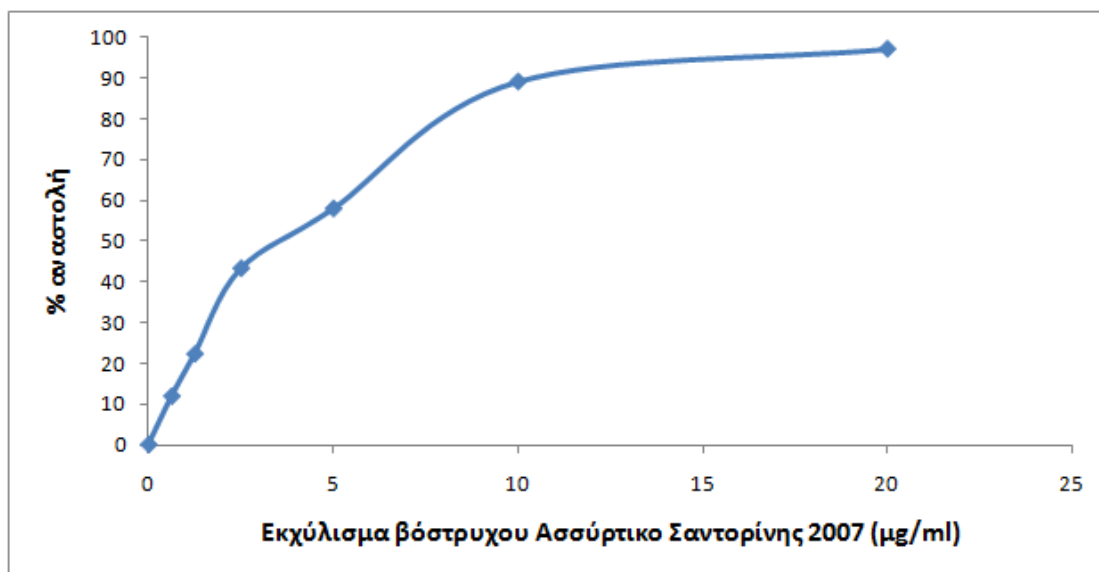
Διάγραμμα 3.2.8 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2008.



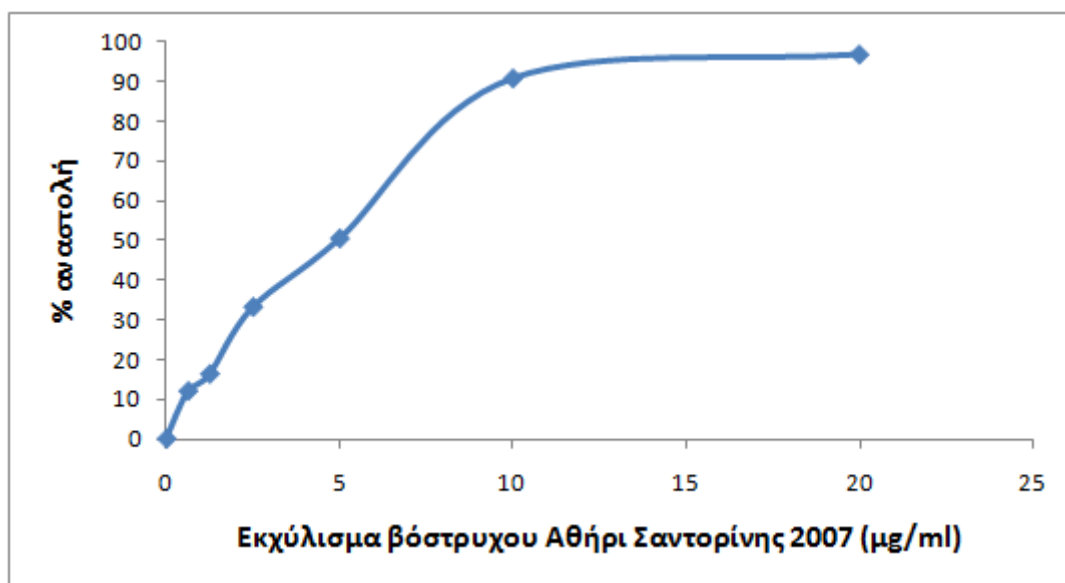
Διάγραμμα 3.2.9 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2007.



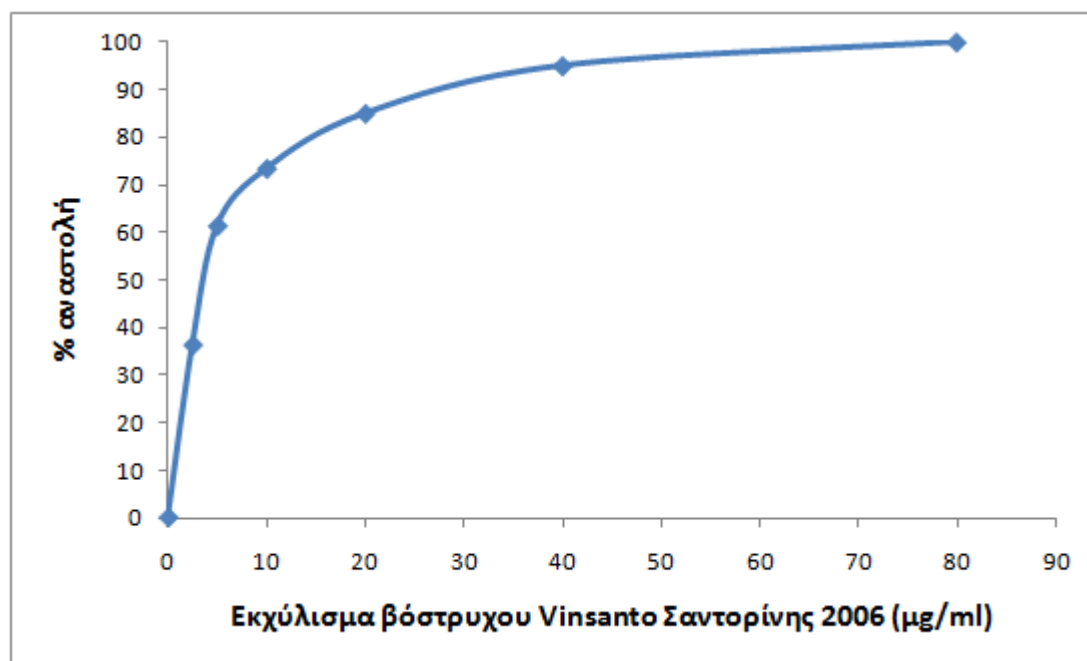
Διάγραμμα 3.2.10 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007.



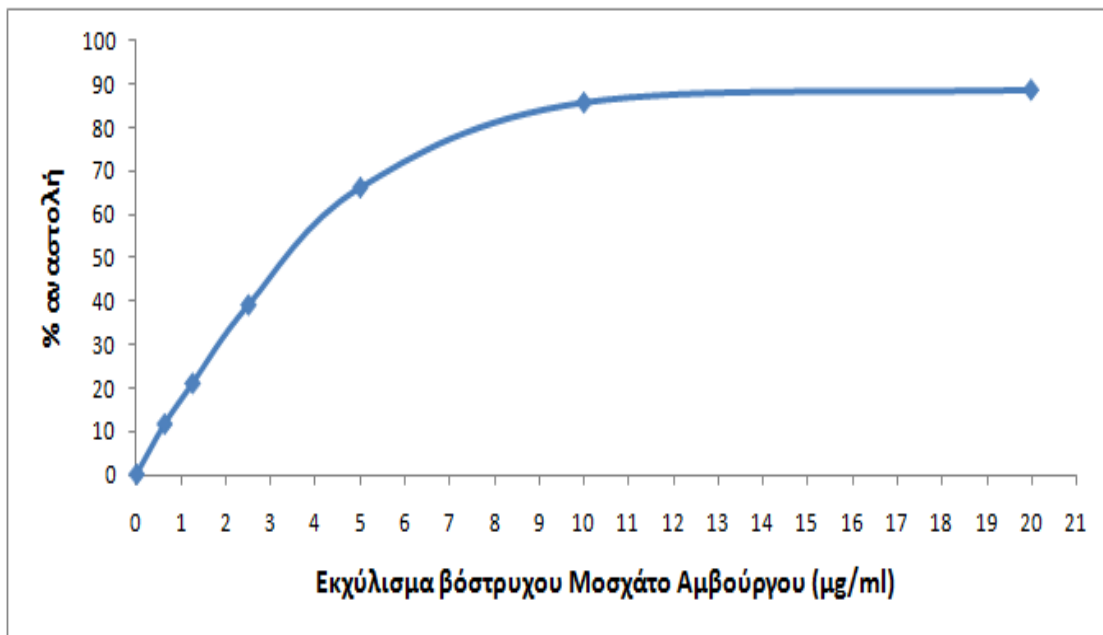
Διάγραμμα 3.2.11 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα στέμφυλων της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2007.



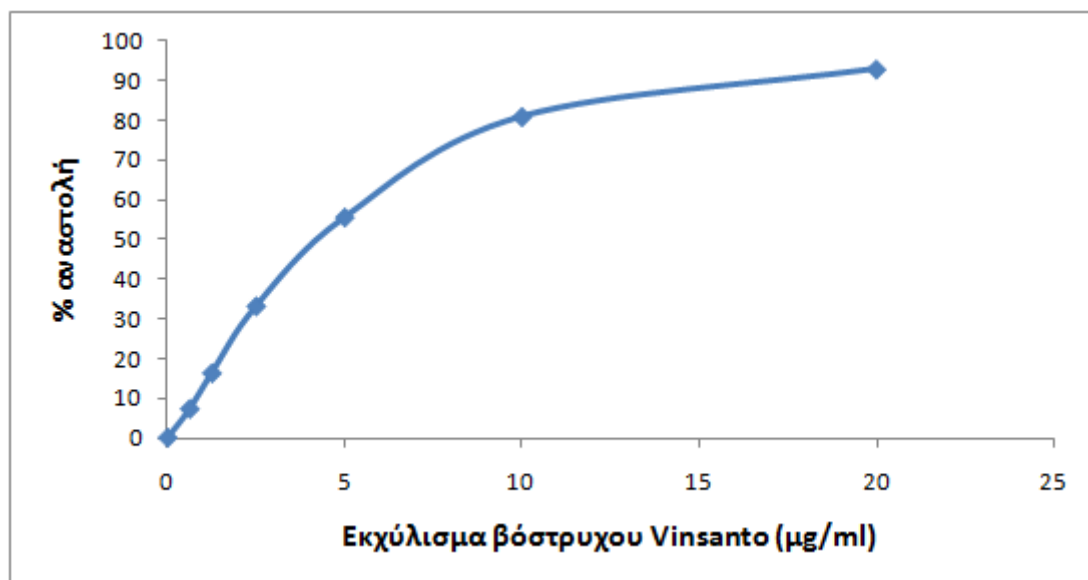
Διάγραμμα 3.2.12 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Αθήρι Σαντορίνης 2007.



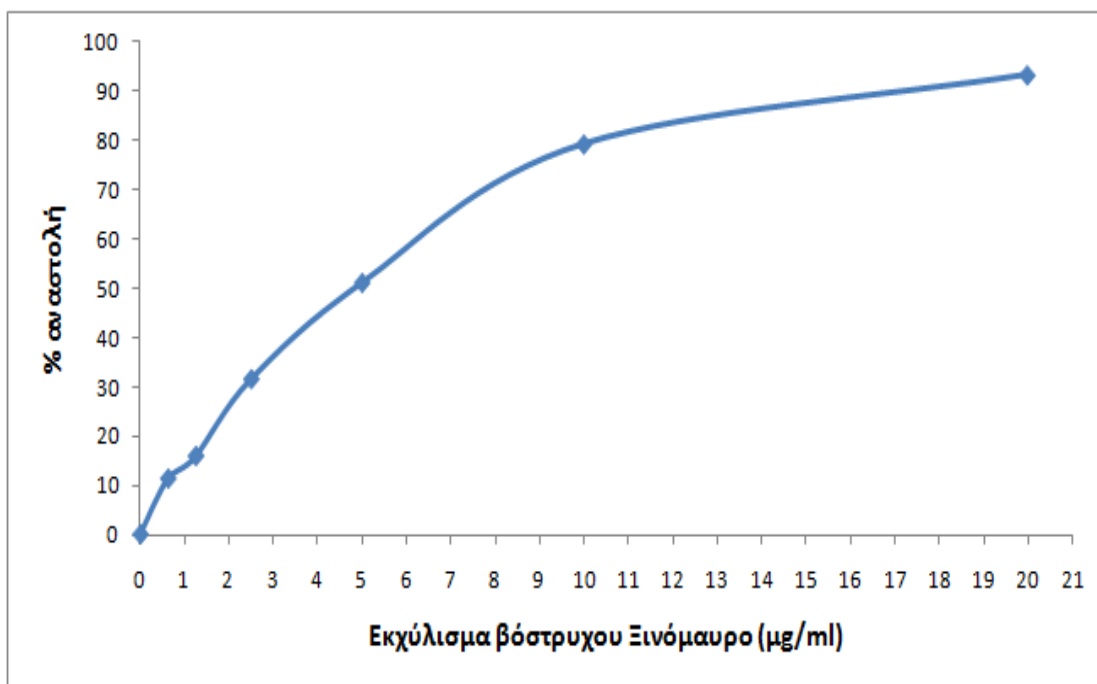
Διάγραμμα 3.2.13 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Vinsanto 2006.



Διάγραμμα 3.2.14 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Μοσχάτο Αμβούργου.



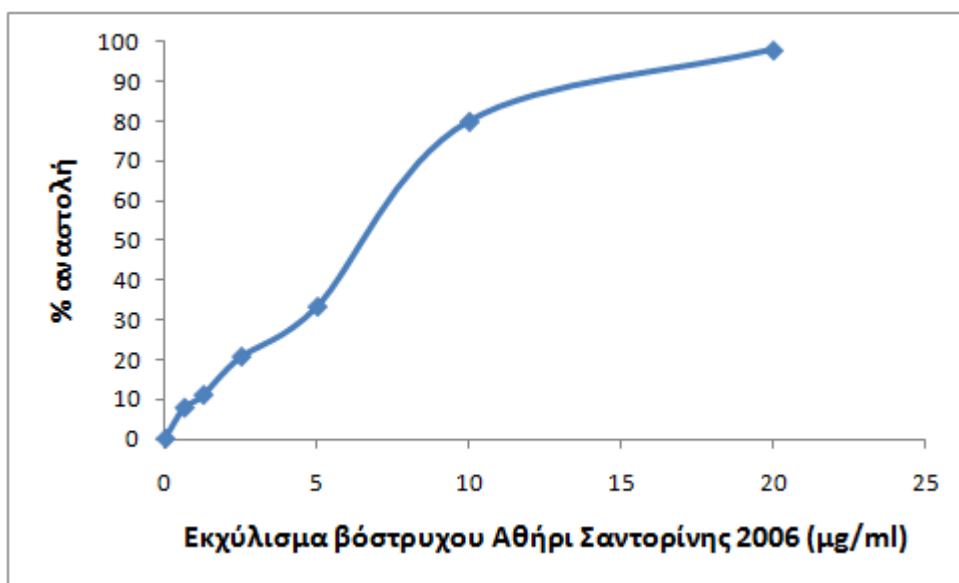
Διάγραμμα 3.2.15 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Vinsanto.



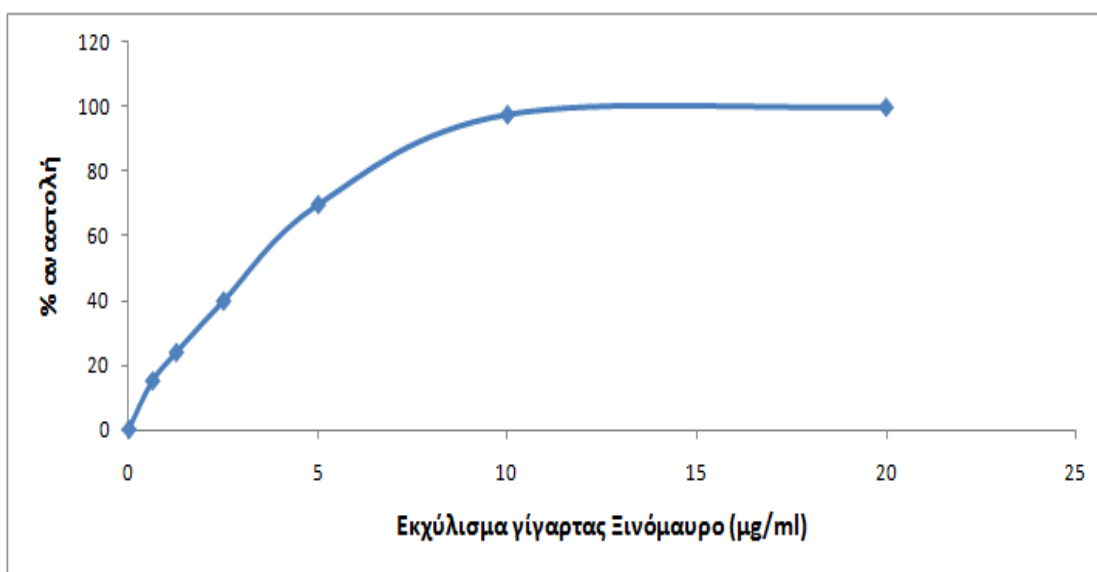
Διάγραμμα 3.2.16 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Ξινόμαυρο.



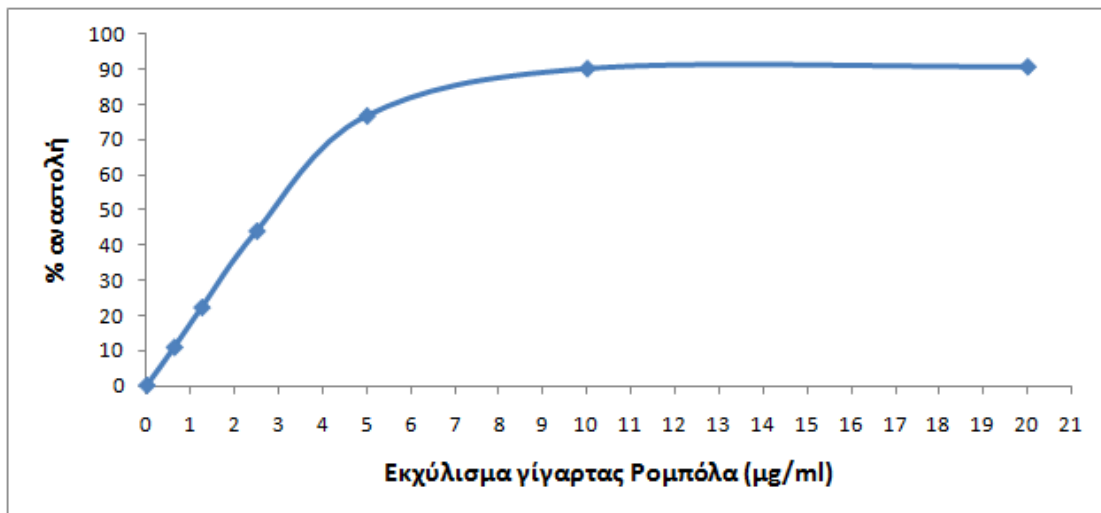
Διάγραμμα 3.2.17 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βηλάνα Σητείας.



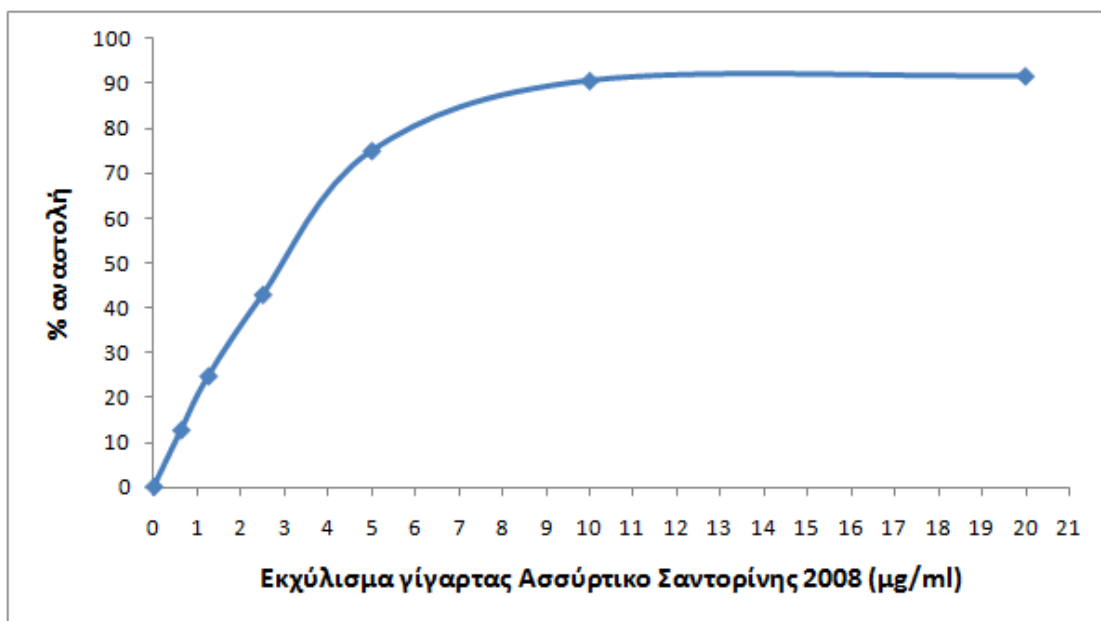
Διάγραμμα 3.2.18 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Αθήρι Σαντορίνης 2006.



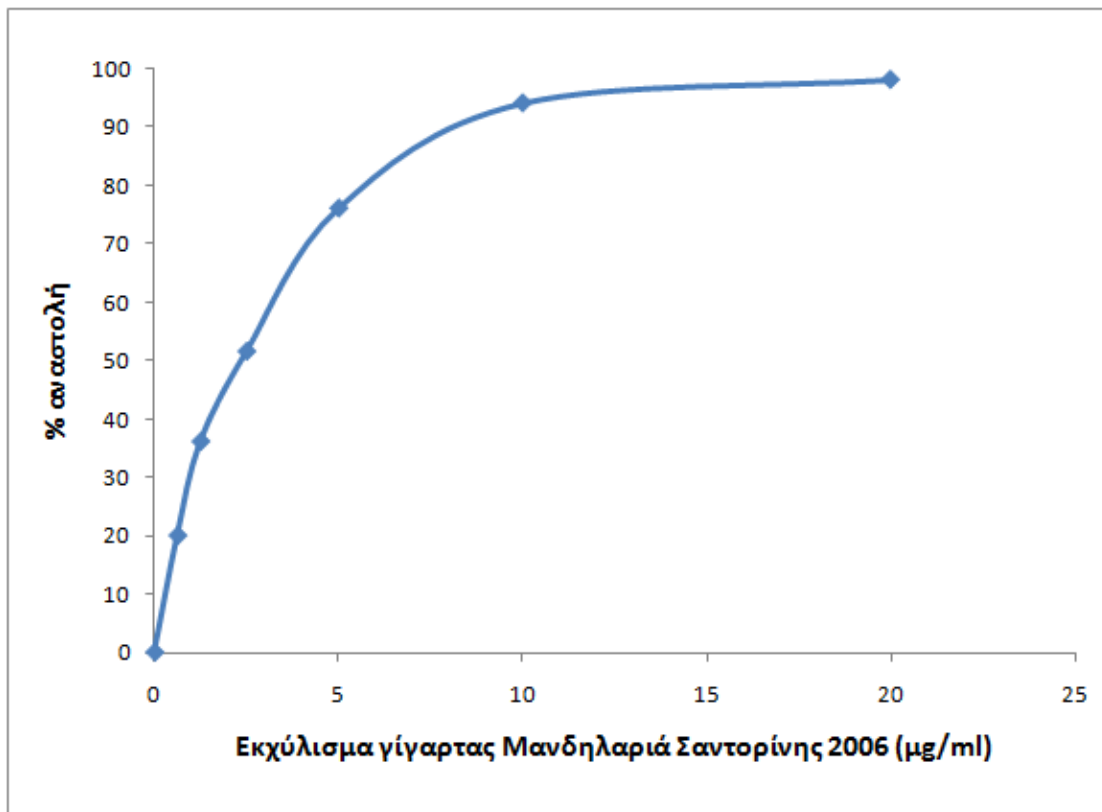
Διάγραμμα 3.2.19 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ξινόμαυρο.



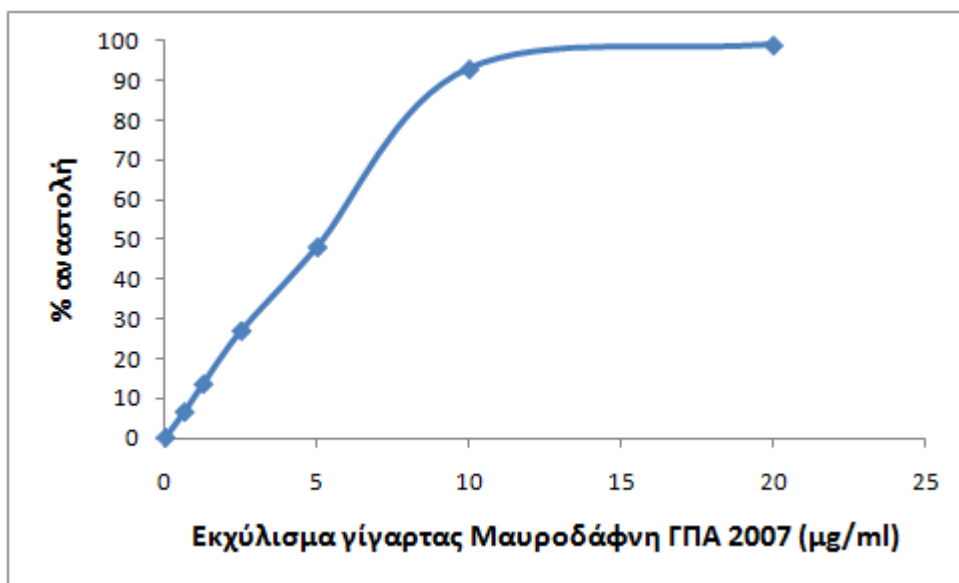
Διάγραμμα 3.2.20 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ρομπόλα.



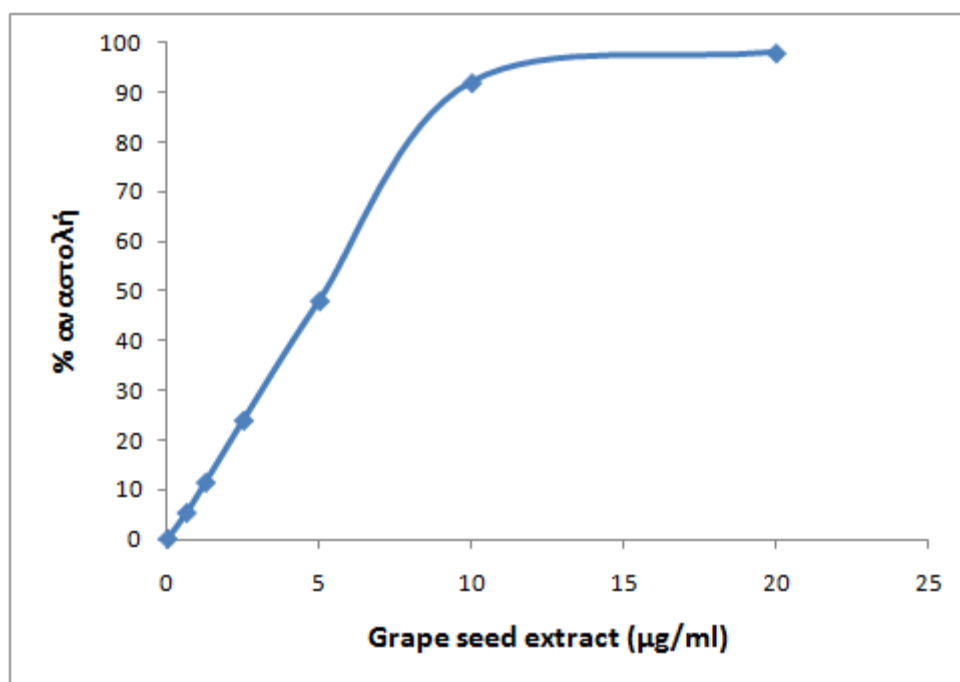
Διάγραμμα 3.2.21 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ασύρτικο Σαντορίνης 2008.



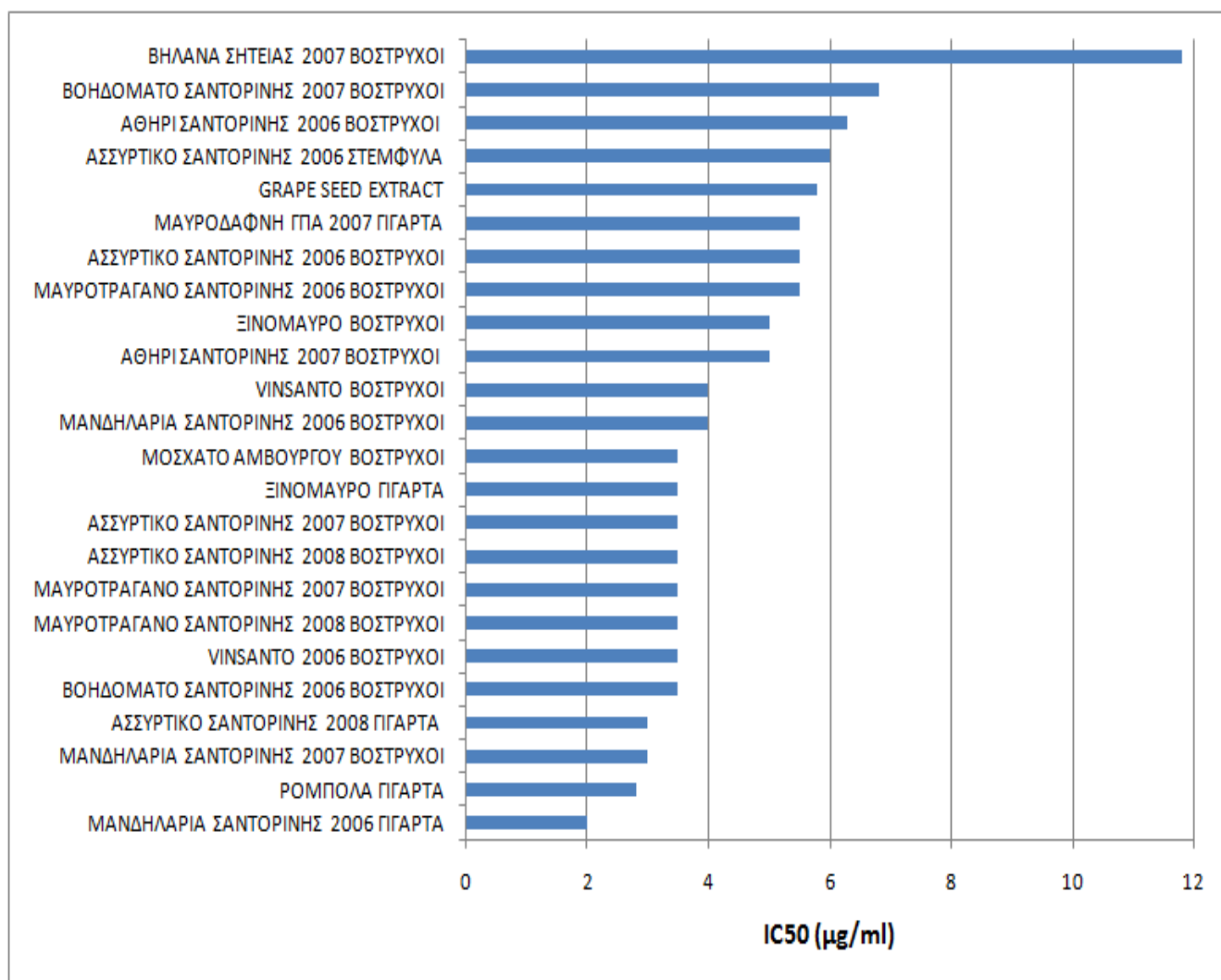
Διάγραμμα 3.2.22 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006.



Διάγραμμα 3.2.23 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή (εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Μαυροδάφνη ΓΠΑ 2007.



Διάγραμμα 3.2.24 Το διάγραμμα απεικονίζει την % αναστολή(εξουδετέρωση) της ρίζας ABTS από το εκχύλισμα Grape seed extract.



Γράφημα 3.2 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου για την αλληλεπίδραση με την ρίζα ABTS .

3.3 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•) και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής-αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.

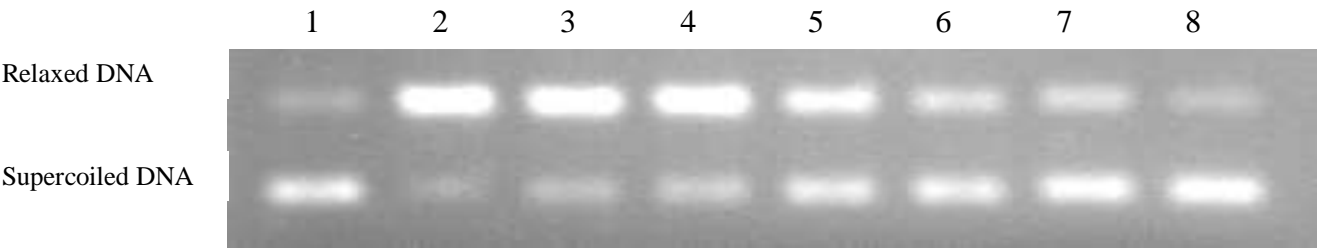
Στην μέθοδο αυτή εξετάστηκαν 20 εκχυλίσματα. Δεν εξετάστηκε η ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008 η οποία εξετάστηκε στις μεθόδους με το DPPH και το ABTS. Τα εκχυλίσματα από όλες τις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου που μελετήθηκαν ανέστειλαν δοσοεξαρτώμενα την επαγωγή θραύσεων στο πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου (OH•). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι μπορούν να εξουδετερώνουν τη ρίζα

υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$), παρουσιάζοντας αντιοξειδωτική-αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Οι τιμές IC_{50} όλων των εκχυλίσμάτων φαίνονται στο γράφημα 3.3 και είναι ενδεικτικές της αντιοξειδωτικής ικανότητας τους: όσο μικρότερη είναι η τιμή IC_{50} τόσο μεγαλύτερη η αντιοξειδωτική ικανότητα του εκχυλίσματος. Οι τιμές των IC_{50} κυμαίνονται από 170 $\mu\text{g/ml}$ έως 4200 $\mu\text{g/ml}$. (Γράφημα 3.3)

Την μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα ανάμεσα στα εκχυλίσματα βόστρυχου εμφάνισε το εκχύλισμα της ποικιλίας Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 με τιμή IC_{50} ίση με 200 $\mu\text{g/ml}$ (Διάγραμμα 3.3.1) πολύ κοντά στο χαμηλότερο IC_{50} (170 $\mu\text{g/ml}$) που εμφανίζεται και που αντιστοιχεί στο εκχύλισμα γίγαρτων της ποικιλίας Ξινόμαυρο (Διάγραμμα 3.3.18). Το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βηλάνια Σητείας 2007 (Διάγραμμα 3.3.13) εμφάνισε πολύ υψηλή τιμή IC_{50} σε σχέση με τα εκχυλίσματα που μελετήθηκαν, δηλαδή παρουσίασε την μικρότερη αντιοξειδωτική/αντιμεταλλαξιγόνο δράση. Επίσης, σχετικά χαμηλότερη αντιμεταλλαξιγόνο ικανότητα συγκριτικά με το σύνολο των εκχυλίσμάτων, παρουσίασαν τα εκχυλίσματα βόστρυχου από Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006, από Βοηδόματο Σαντορίνης 2007 και από Ξινόμαυρο (Διαγράμματα 3.3.10, 3.3.12 και 3.3.7) και οι τιμές του IC_{50} ήταν και στα τρία 800 $\mu\text{g/ml}$ (Γράφημα 3.3). Τα περισσότερα εκχυλίσματα βόστρυχου (συγκεκριμένα 11 από τα 16 που μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν) (Διαγράμματα 3.3.1, 3.3.9, 3.3.11, 3.3.5, 3.3.3, 3.3.4, 3.3.6, 3.3.8) και τα εκχυλίσματα βόστρυχων από τις ποικιλίες Αθήρι Σαντορίνης 2006, Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007 και Αθήρι Σαντορίνης 2007 (Ακριβούλη 2007), όπως και τα εκχυλίσματα του Grape seed (Διάγραμμα 3.3.16), τριών εκχυλίσμάτων γίγαρτας (Διαγράμματα 3.3.19, 3.3.17, 3.3.14) και των στέμφυλων του Ασύρτικου Σαντορίνης 2007 (Διάγραμμα 3.3.20) είχαν IC_{50} μεταξύ των τιμών 200 $\mu\text{g/ml}$ και 400 $\mu\text{g/ml}$ (Γράφημα 3.3). Τα εκχυλίσματα βόστρυχων από τις ποικιλίες Αθήρι Σαντορίνης 2006, Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007 και Αθήρι Σαντορίνης 2007 είχαν εξεταστεί σε άλλη μελέτη (Ακριβούλη 2007).

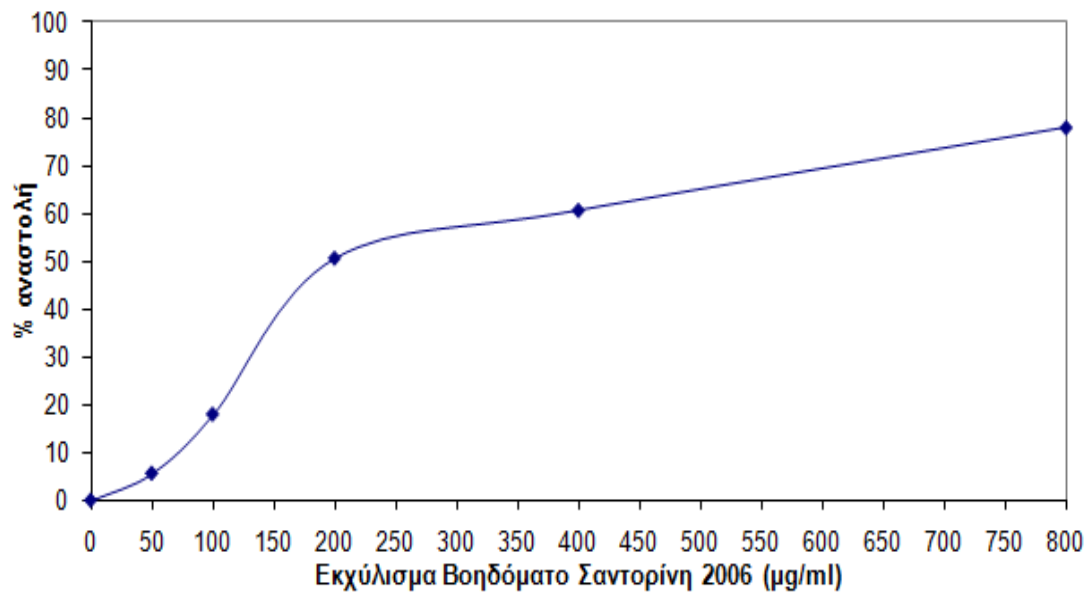
Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν είχαν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες υδροξυλίου ($\text{OH}\cdot$).

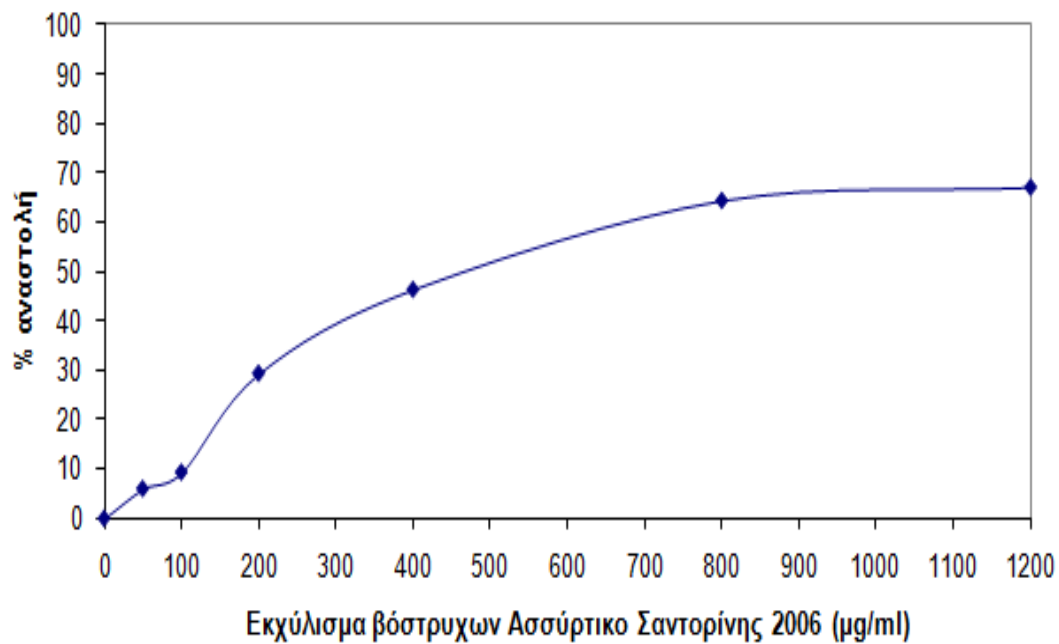


Αντιπροσωπευτική εικόνα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αγαρόζης.

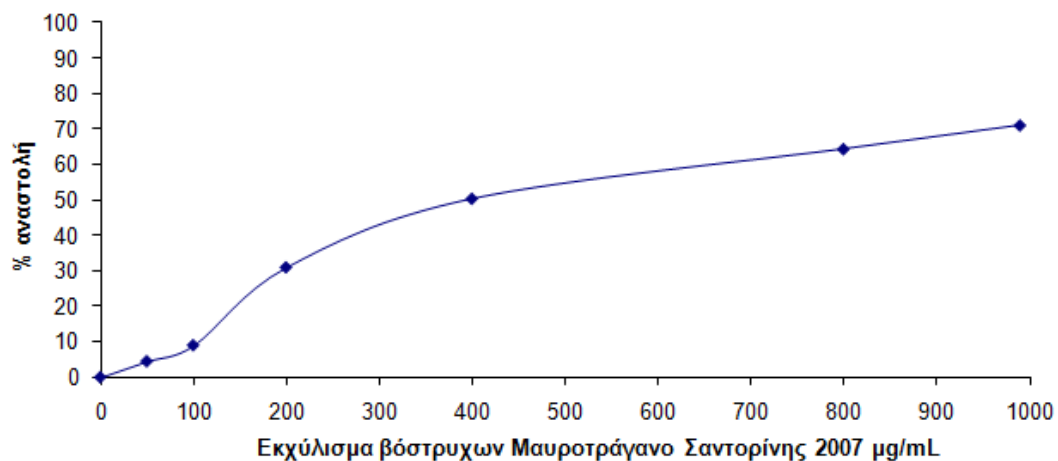
- Σειρά 1: DNA plasmid
- Σειρά 2: DNA plasmid + H₂O₂
- Σειρά 3: DNA plasmid + H₂O₂ + 100 µg/ml εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008
- Σειρά 4: DNA plasmid + H₂O₂ + 200 µg/ml εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008
- Σειρά 5: DNA plasmid + H₂O₂ + 400 µg/ml εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008
- Σειρά 6: DNA plasmid + H₂O₂ + 800 µg/ml εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008
- Σειρά 7: DNA plasmid + H₂O₂ + 1200 µg/ml εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008
- Σειρά 8: DNA plasmid + 1200 µg/ml εκχυλίσματος Ασσύρτικο Σαντορίνης 2008



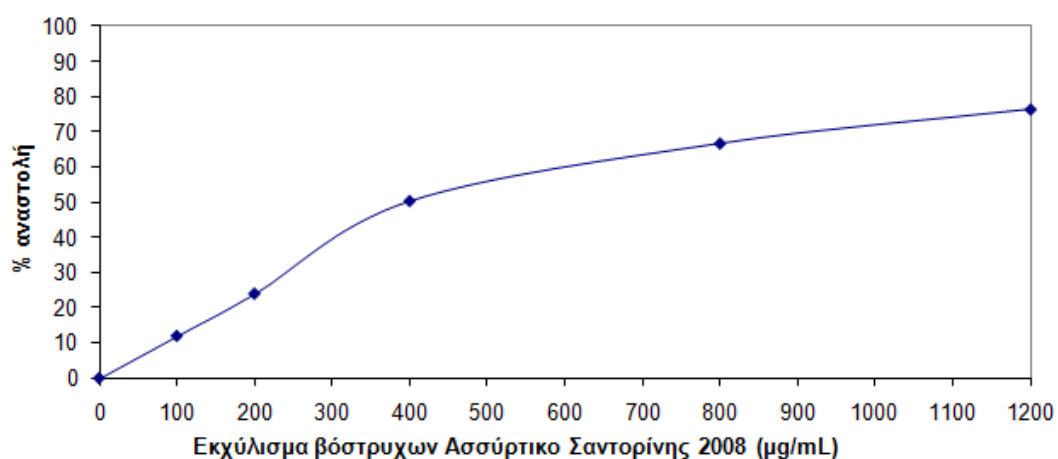
Διάγραμμα 3.3.1 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



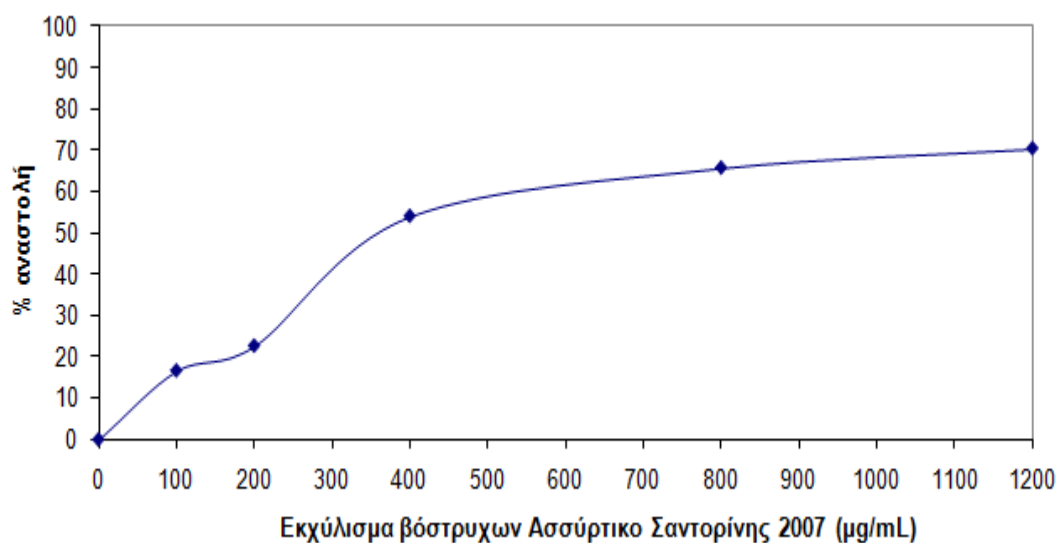
Διάγραμμα 3.3.2 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



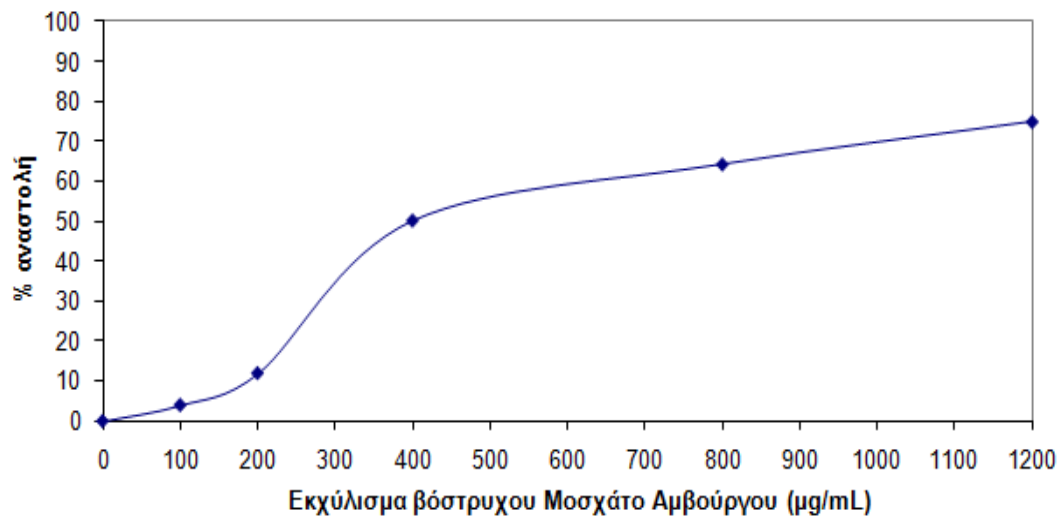
Διάγραμμα 3.3.3 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



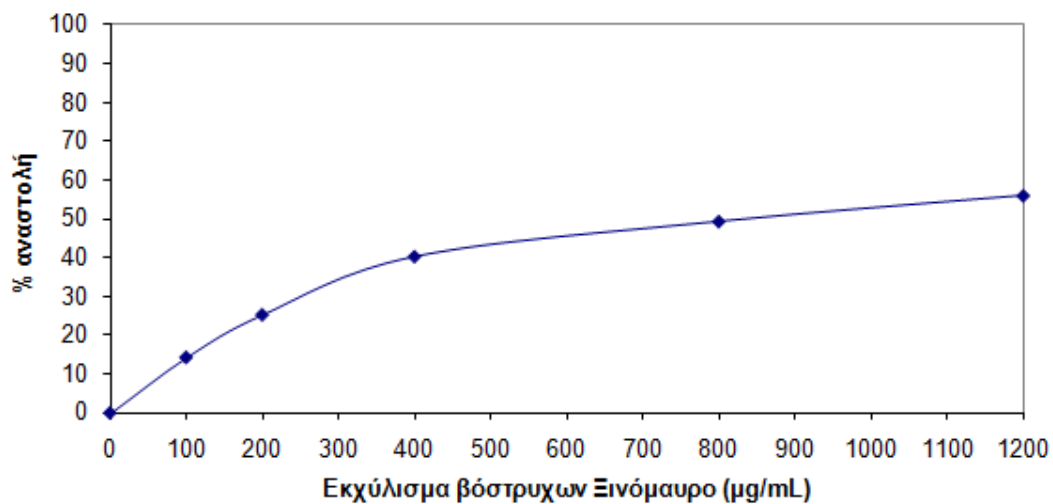
Διάγραμμα 3.3.4 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



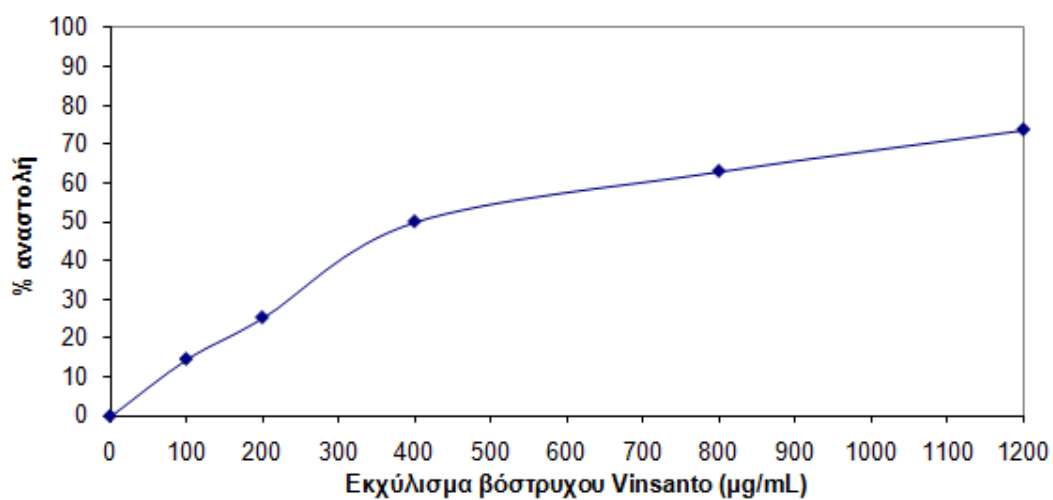
Διάγραμμα 3.3.5 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



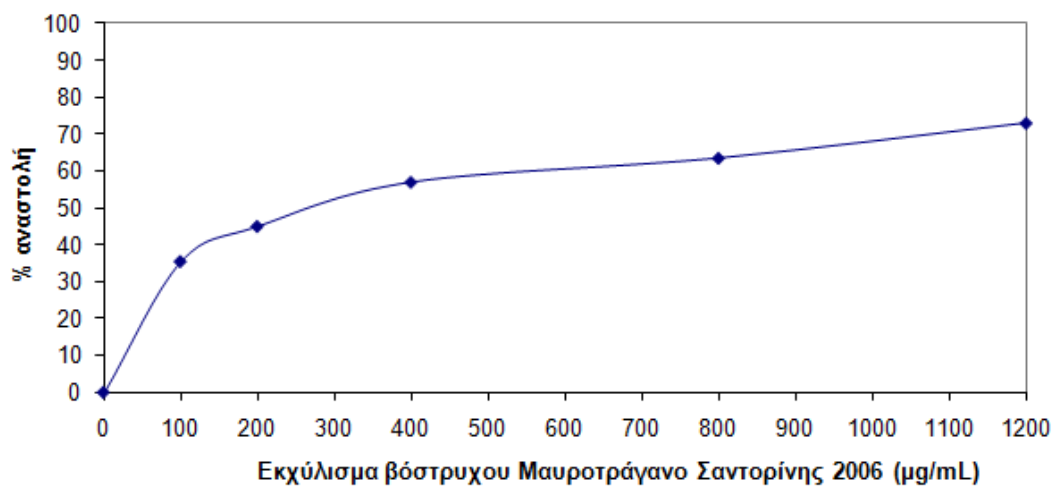
Διάγραμμα 3.3.6 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



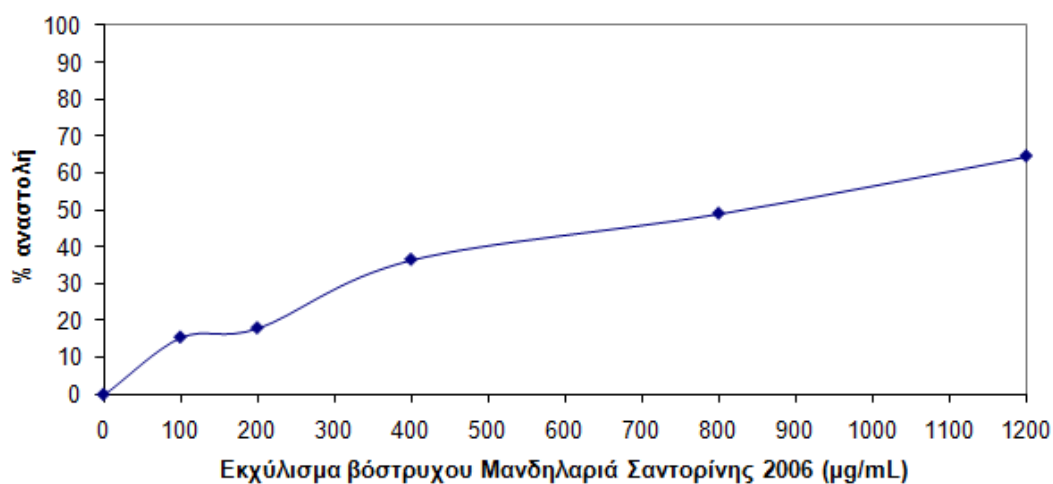
Διάγραμμα 3.3.7 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ξινόμαυρο στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



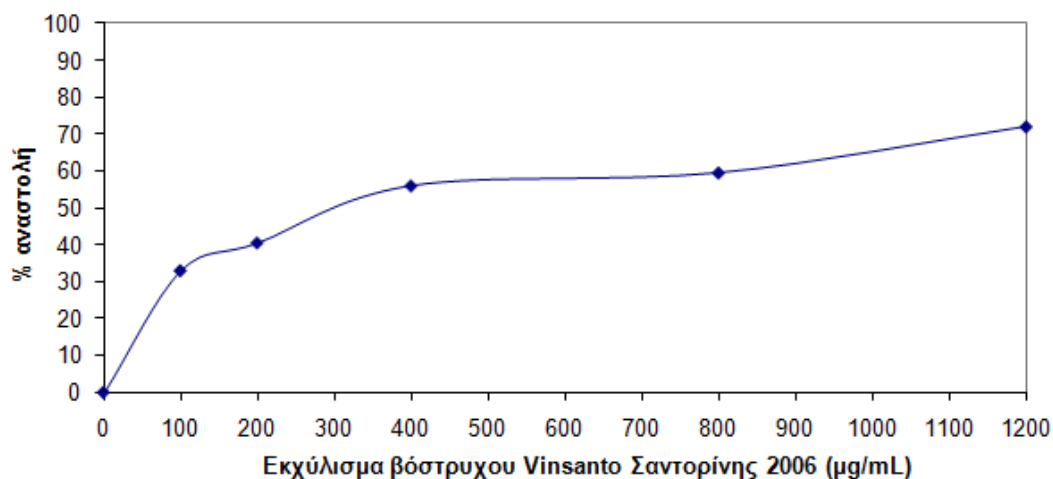
Διάγραμμα 3.3.8 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Vinsanto στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



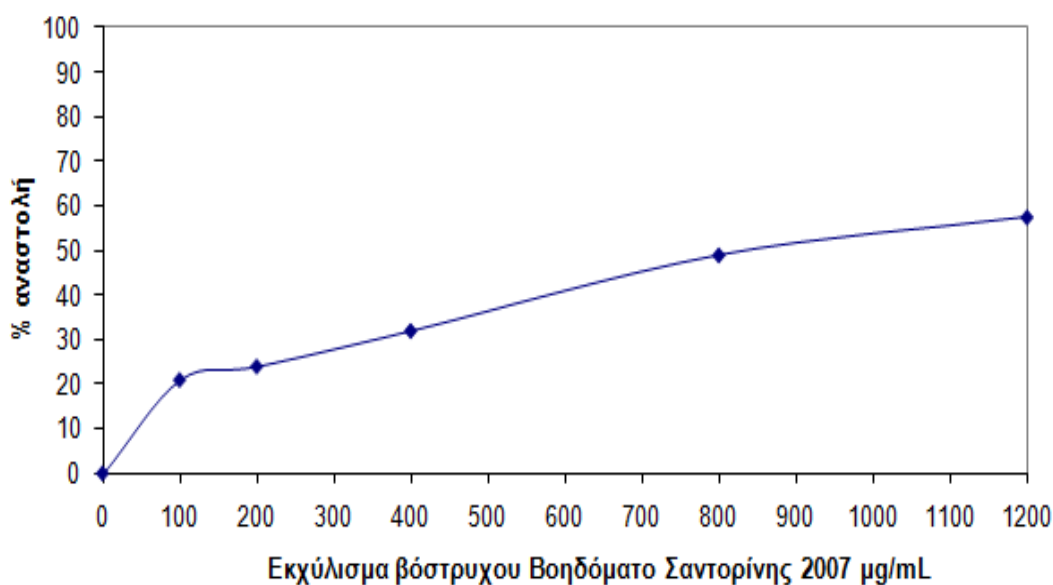
Διάγραμμα 3.3.9 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



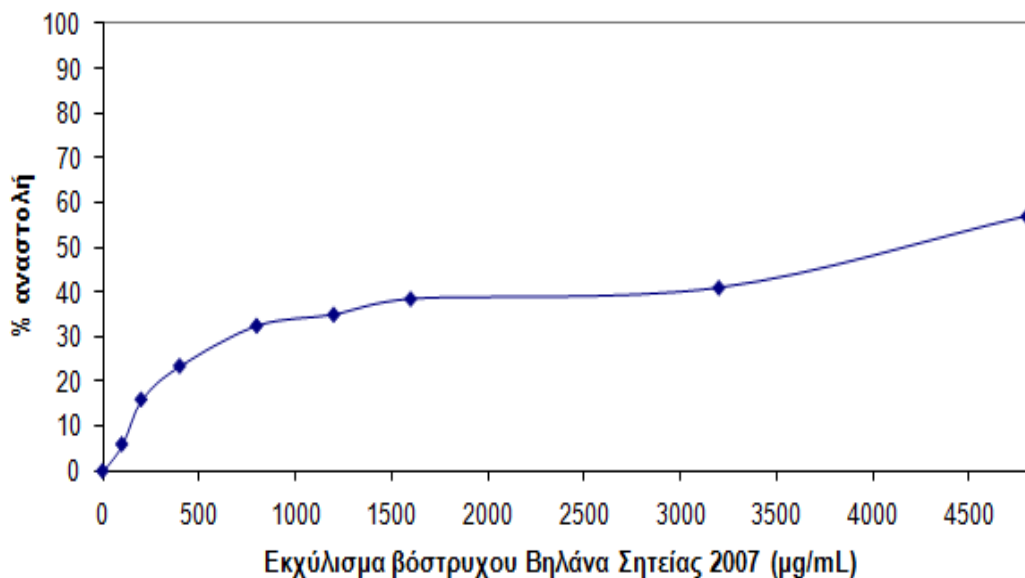
Διάγραμμα 3.3.10 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



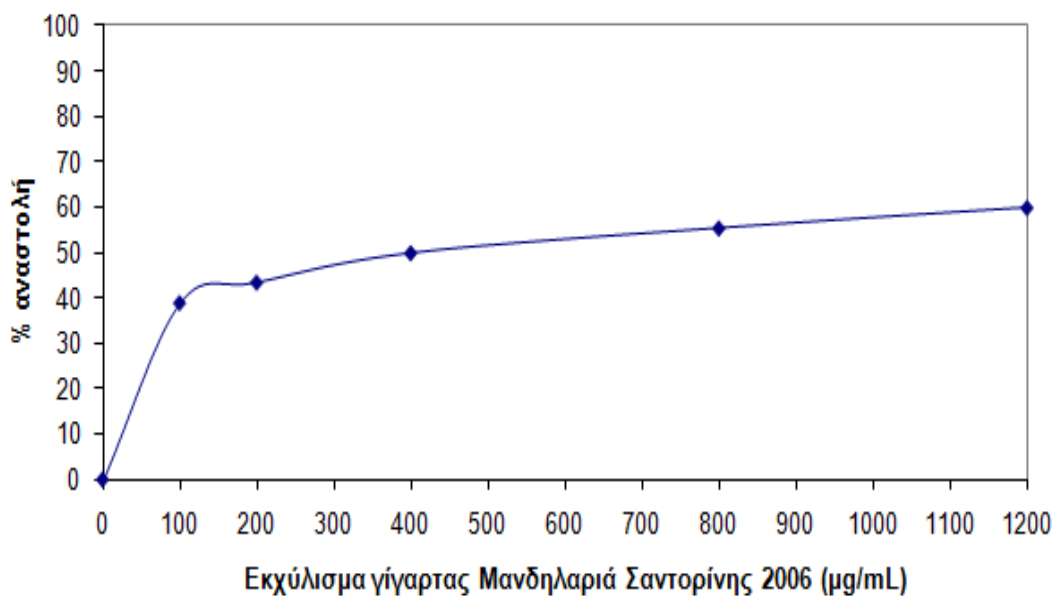
Διάγραμμα 3.3.11 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Vinsanto Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



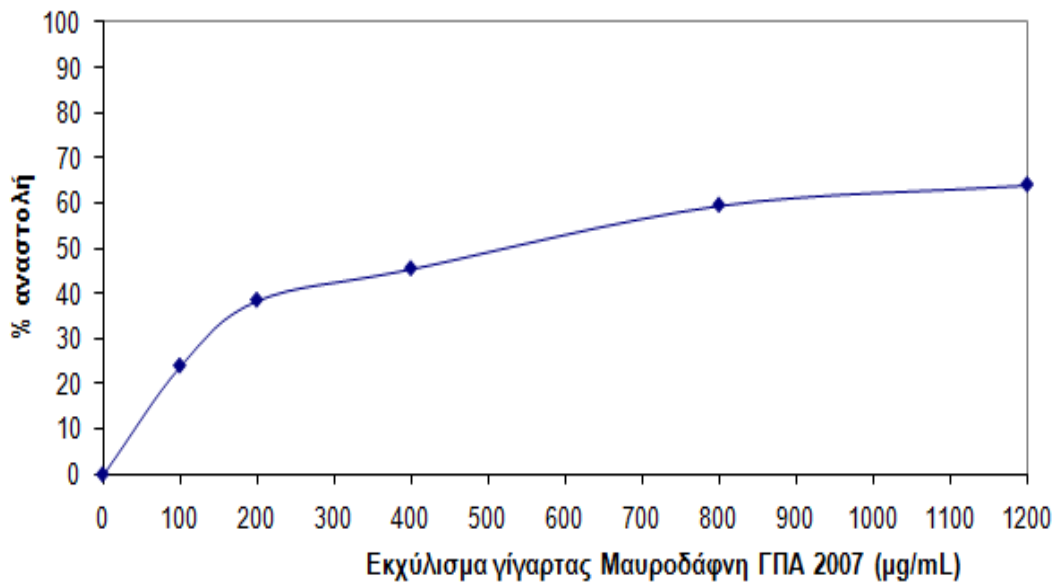
Διάγραμμα 3.3.12 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Βοηδόματο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



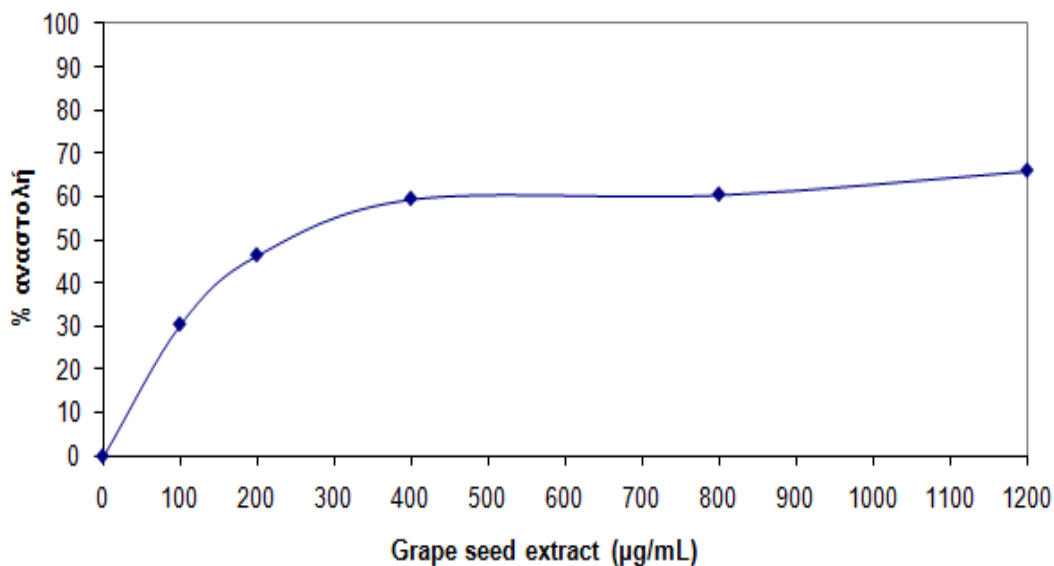
Διάγραμμα 3.3.13 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Βηλάνια Σητείας 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



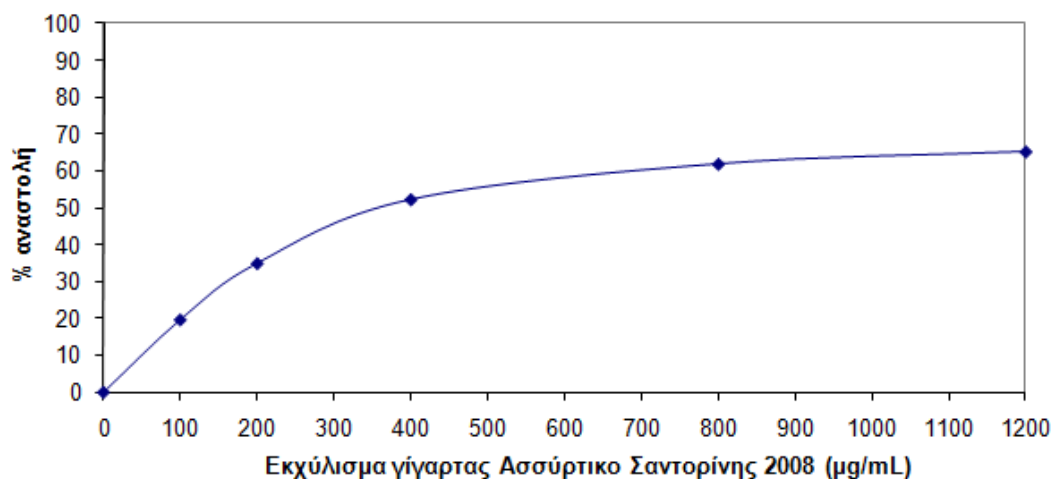
Διάγραμμα 3.3.14 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



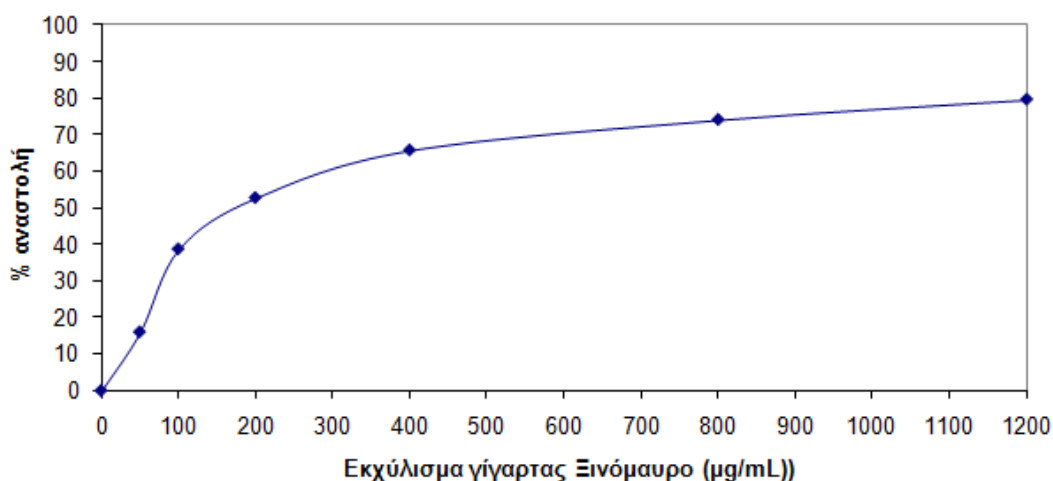
Διάγραμμα 3.3.15 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Μαυροδάφνη ΓΠΑ 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



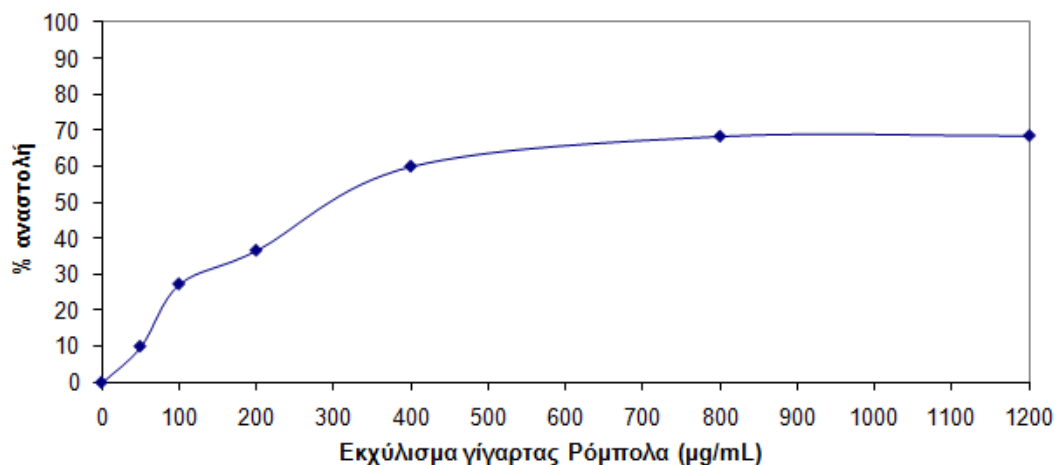
Διάγραμμα 3.3.16 Επίδραση εκχυλίσματος Grape seed στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



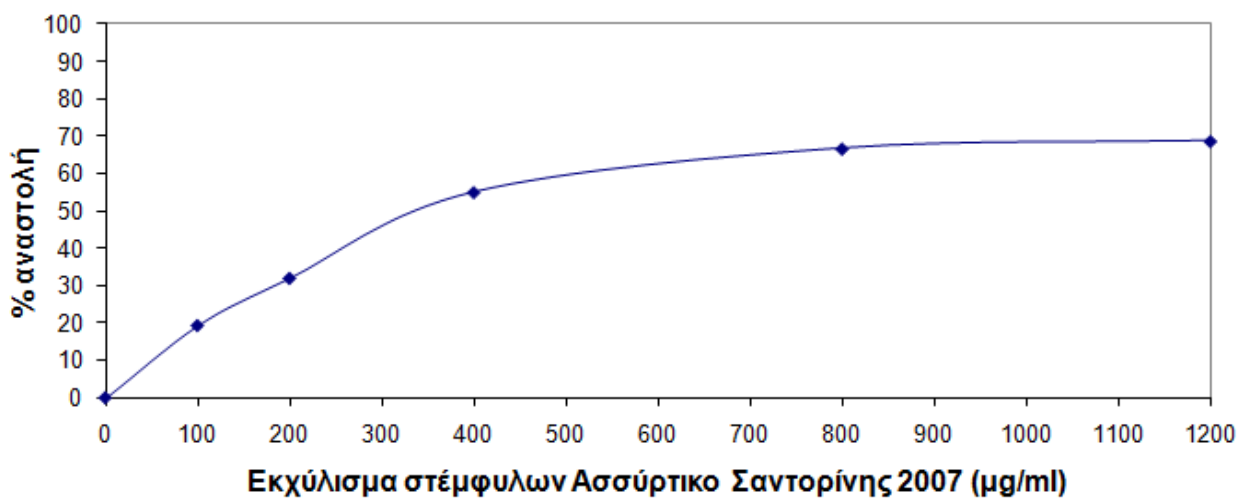
Διάγραμμα 3.3.17 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA



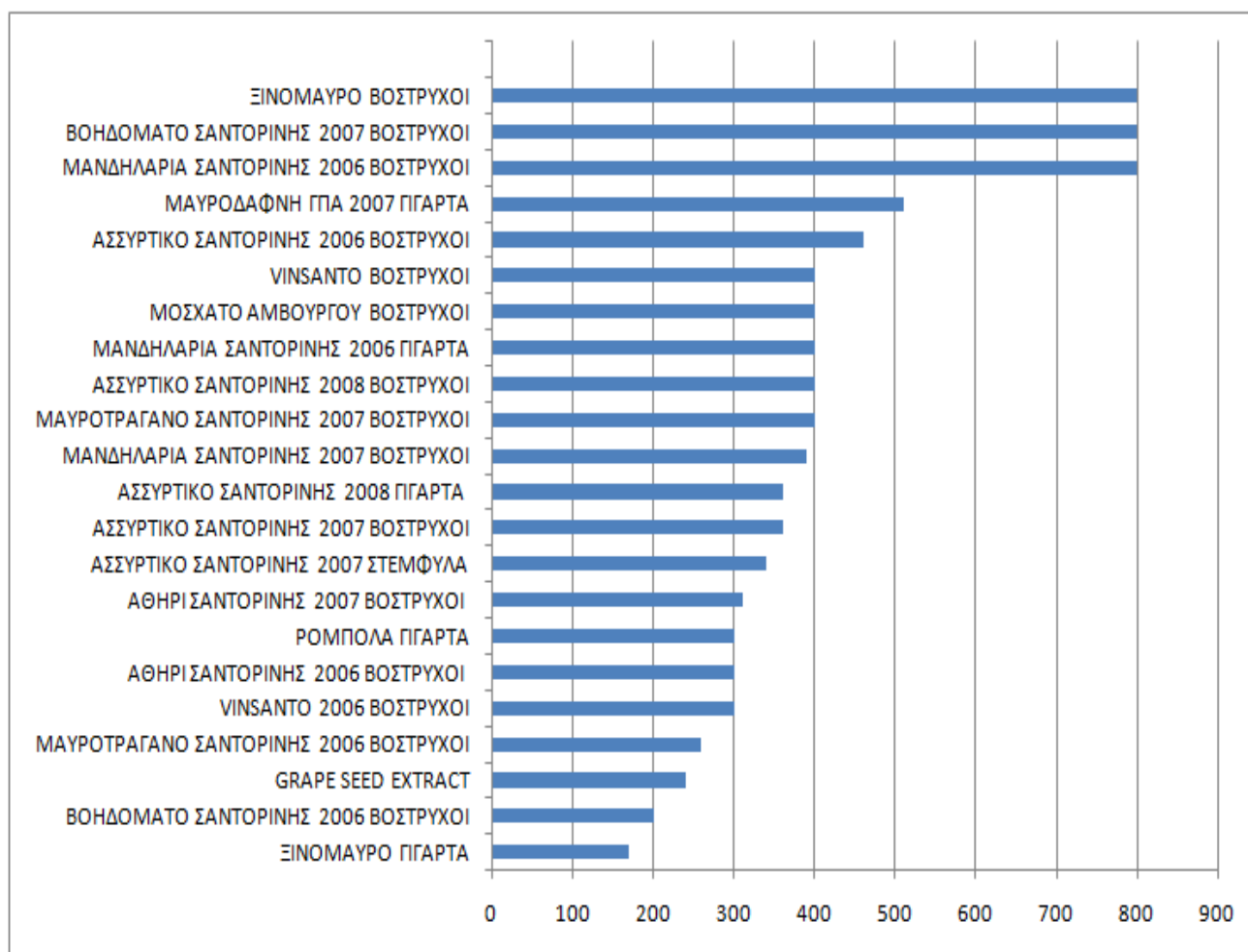
Διάγραμμα 3.3.18 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Ξινόμαυρο στις επαγόμενες από τις ρίζες $\text{OH}\cdot$ ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



Διάγραμμα 3.3.19 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Ρόμπολα στις επαγόμενες από τις ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



Διάγραμμα 3.3.20 Επίδραση εκχυλίσματος στέμφυλων από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες OH^\bullet ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



Γράφημά 3.3 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου έναντι των επαγόμενων από ρίζες OH• ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA. Το IC₅₀ του εκχυλίσματος βόστρυχου της ποικιλίας Βηλάνια Σητείας 2007 ήταν 4200 μg/ml. Τα εκχυλίσματα βόστρυχων από τις ποικιλίες Αθήρι Σαντορίνης 2006, Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007 και Αθήρι Σαντορίνης 2007 είχαν εξεταστεί σε άλλη μελέτη (Ακριβούλη 2007).

3.4 Αποτελέσματα επίδρασης εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου στην αναστολή της επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH•) και εκτίμηση της αντιμεταλλαξιγόνου ικανότητάς τους.

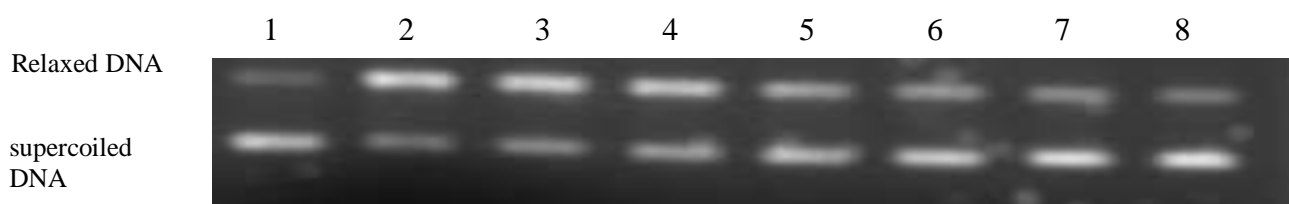
Στην μέθοδο αυτή εξετάστηκαν 20 εκχυλίσματα. Δεν εξετάστηκε η ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2008 η οποία εξετάστηκε στις μεθόδους με το DPPH και το ABTS. Εξετάστηκε η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε συγκεντρώσεις 0,25,

0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 $\mu\text{g/ml}$ με εξαίρεση το εκχύλισμα βόστρυχου της ποικιλίας Βηλάνια Σητείας σε συγκεντρώσεις 1, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g/ml}$. Τα εκχυλίσματα επέδειξαν δόσοεξαρτώμενη προστατευτική – αντιμεταλλαξιγόνο δράση απέναντι στη τοξική δράση των ριζών ROO^\bullet . Σύμφωνα με τις IC_{50} τιμές τους (Γράφημα 3.4), τα εκχυλίσματα αυτά επέδειξαν ισχυρότερη δράση στην επαγόμενη από ROO^\bullet ρίζες βλάβη σε σχέση την αντίστοιχη των ριζών OH^\bullet , με τις τιμές IC_{50} να κυμαίνονται από 0.35 έως 3.70 $\mu\text{g/ml}$.

Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της δράσης αναστολής των εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της επίδρασης του AAPH διαφέρει από εκχύλισμα σε εκχύλισμα με τα εκχυλίσματα από βόστρυχους Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2006 (Διάγραμμα 3.4.10) και βόστρυχους Βοηδόματου Σαντορίνης 2007 (Διάγραμμα 3.4.12) να υπερισχύουν. Το εκχύλισμα από βόστρυχους Ξινόμαυρου (Διάγραμμα 3.4.) παρουσίασε την μικρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα, η οποία όμως είναι αρκετά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη οποιουδήποτε εκχυλίσματος απέναντι στις ρίζες OH^\bullet .

Αξίζει να σημειωθεί ότι όλα τα εκχυλίσματα δεν είχαν οποιαδήποτε επίδραση στο DNA, όταν εξετάστηκαν μόνα τους στην υψηλότερη εξεταζόμενη συγκέντρωση.

Αποτελέσματα επαγωγής θραύσεων σε πλασμιδιακό DNA από ρίζες περοξυλίου (ROOH^\bullet)



Αντιπροσωπευτική εικόνα από ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πηκτή αгарόζης.

Σειρά 1: DNA plasmid

Σειρά 2: DNA plasmid + AAPH

Σειρά 3: DNA plasmid + AAPH + 0,25 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

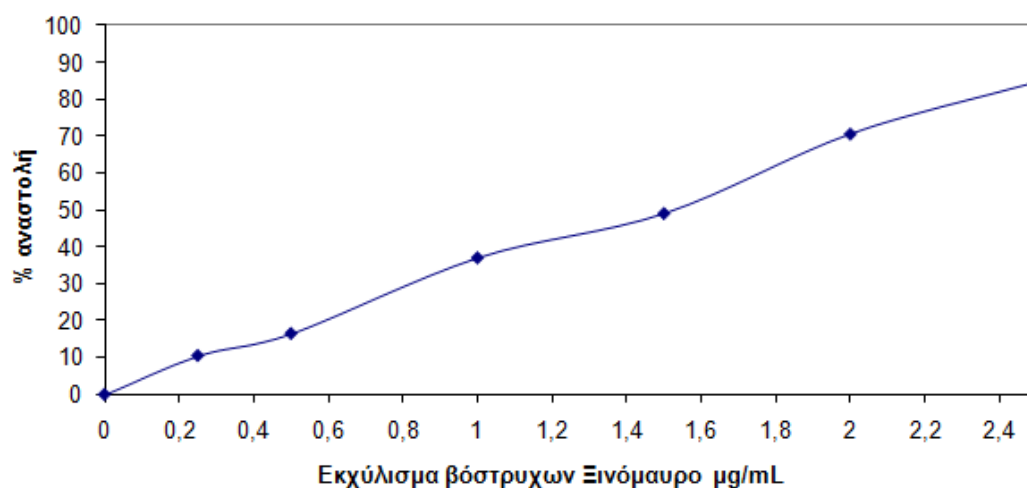
Σειρά 4: DNA plasmid + AAPH + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

Σειρά 5: DNA plasmid + AAPH + 1 $\mu\text{g/ml}$ εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

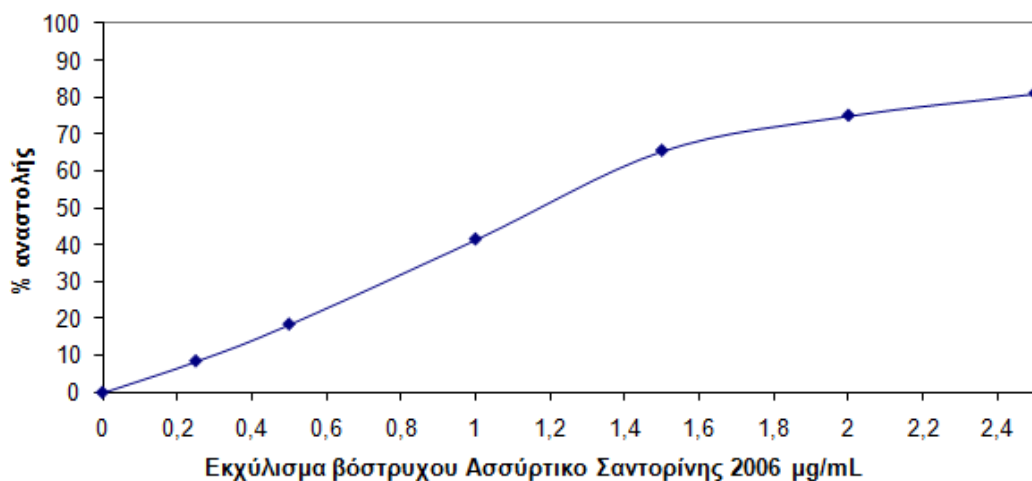
Σειρά 6: DNA plasmid + AAPH + 1,5 µg/ml εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

Σειρά 7: DNA plasmid + AAPH + 2,5 µg/ml εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης

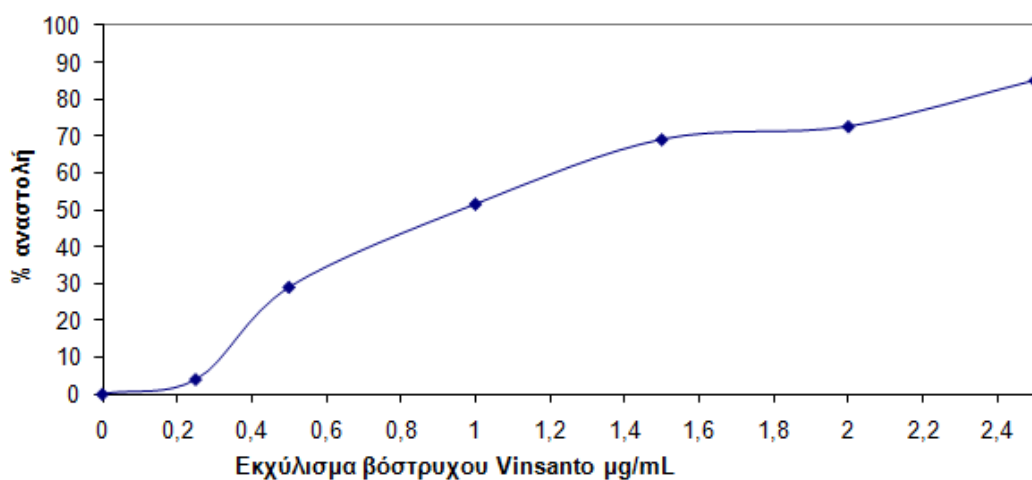
Σειρά 8: DNA plasmid + 2,5 µg/ml εκχυλίσματος Μαυροτράγανο Σαντορίνης



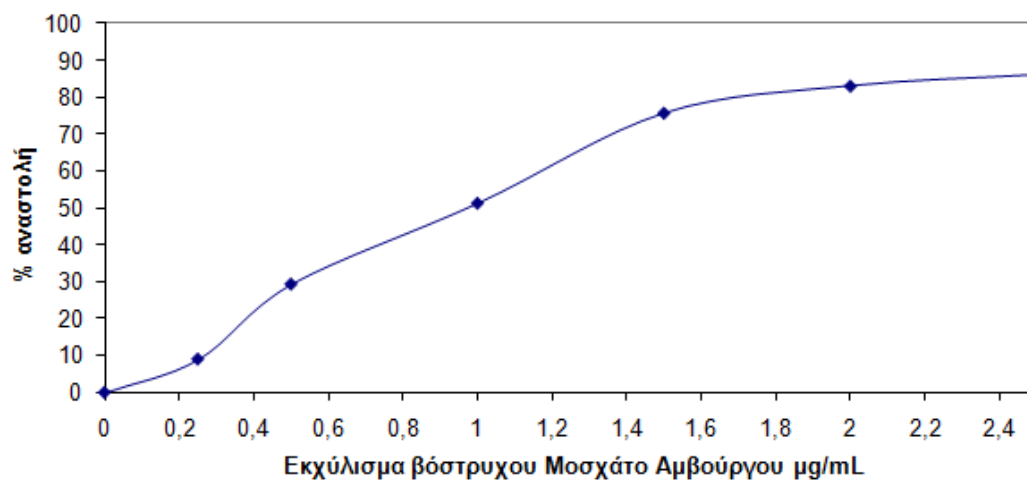
Διάγραμμα 3.4.1 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ξινόμαυρο στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



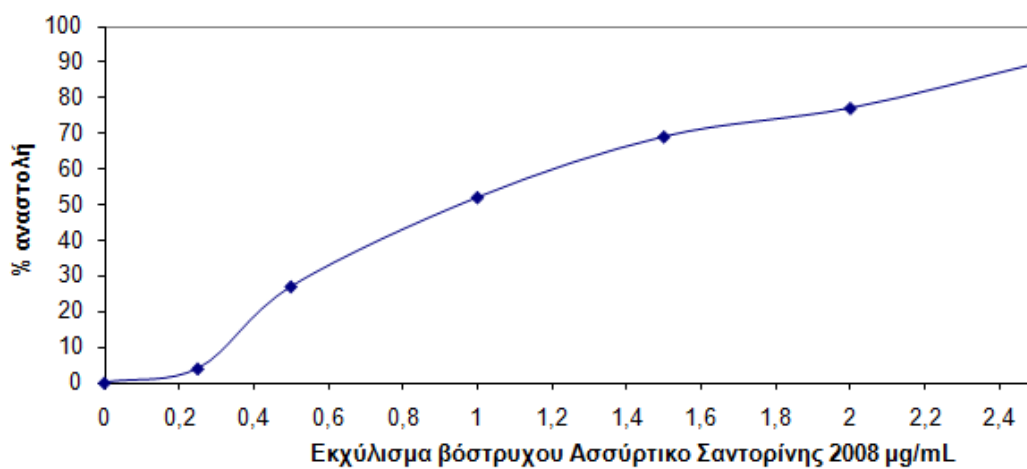
Διάγραμμα 3.4.2 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



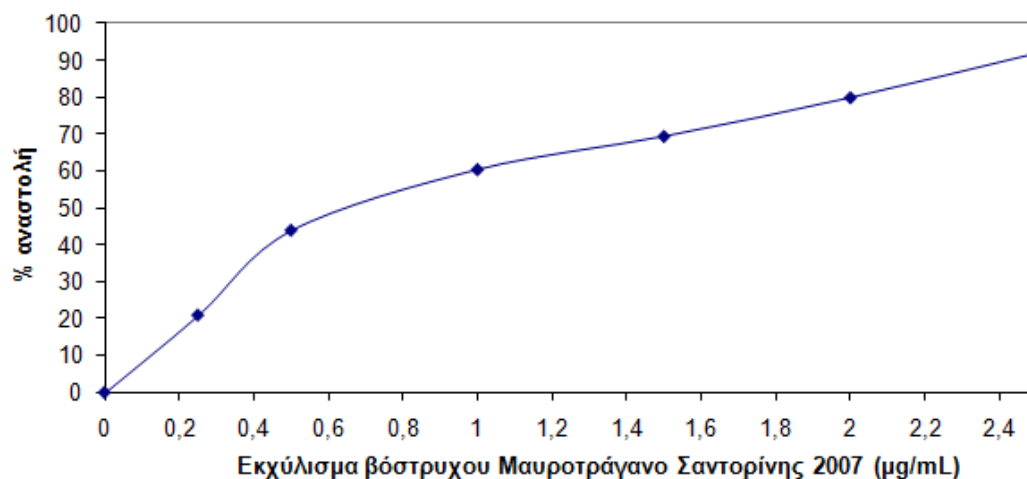
Διάγραμμα 3.4.3 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Vinsanto στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



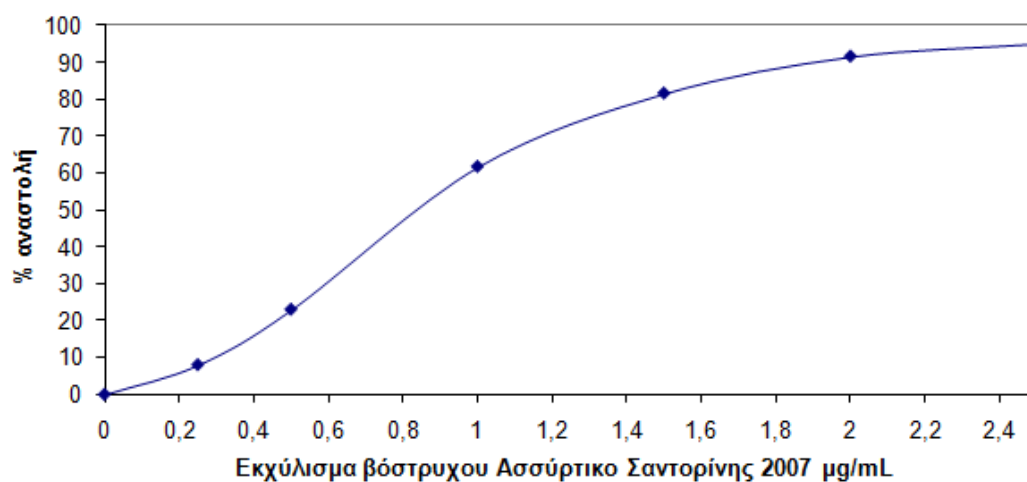
Διάγραμμα 3.4.4 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μοσχάτο Αμβούργου στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



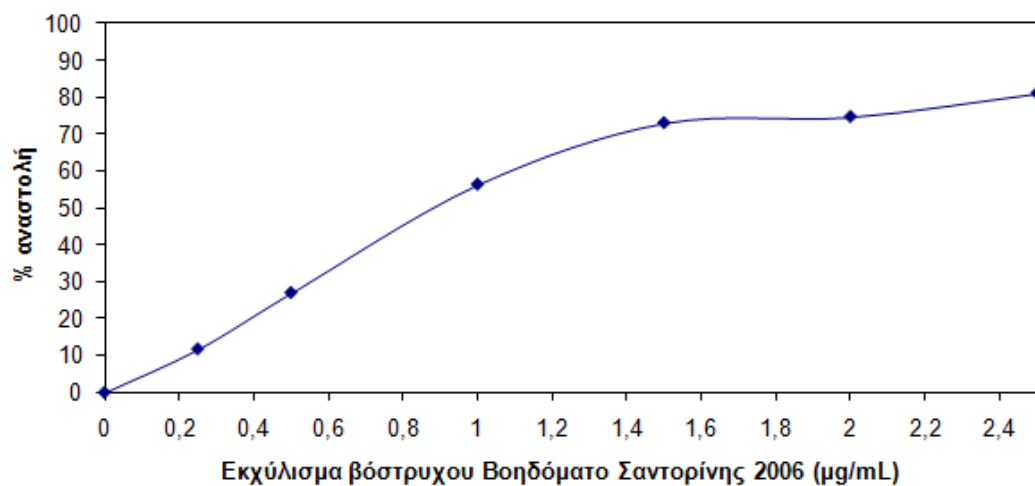
Διάγραμμα 3.4.5 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



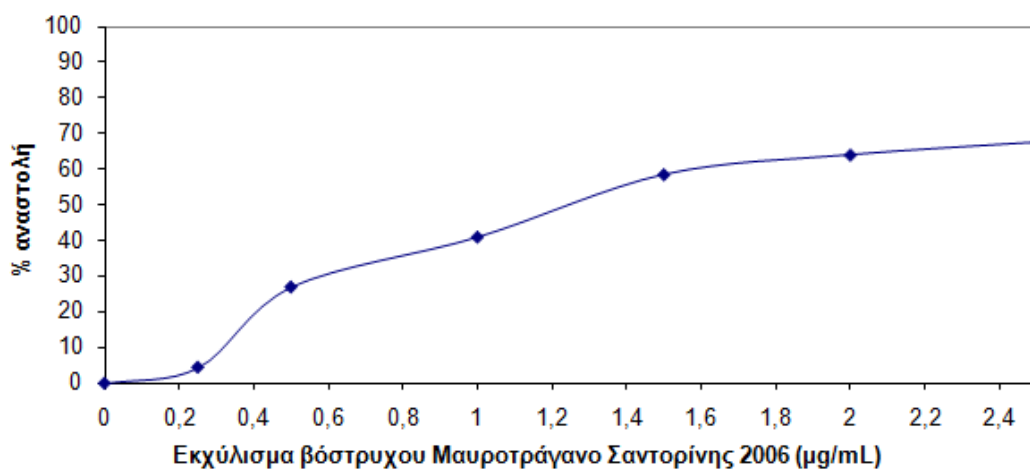
Διάγραμμα 3.4.6 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



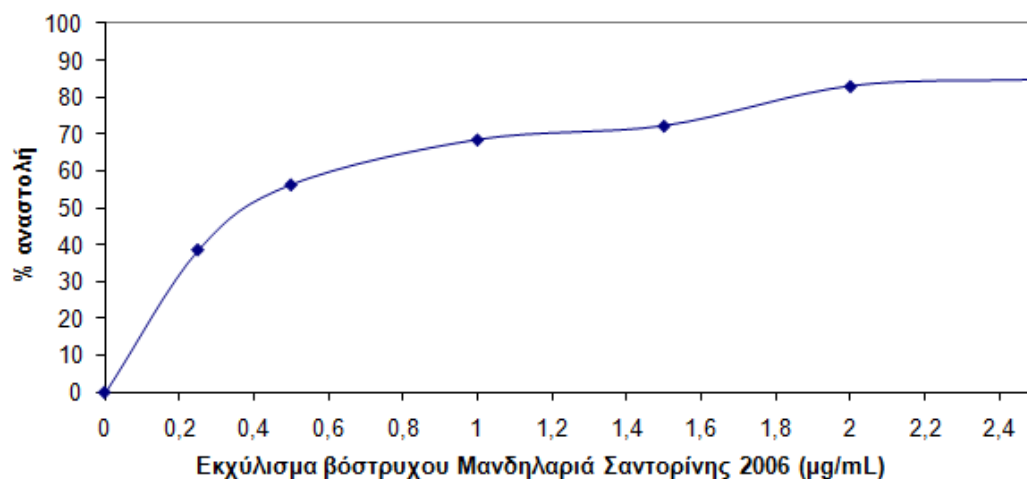
Διάγραμμα 3.4.7 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



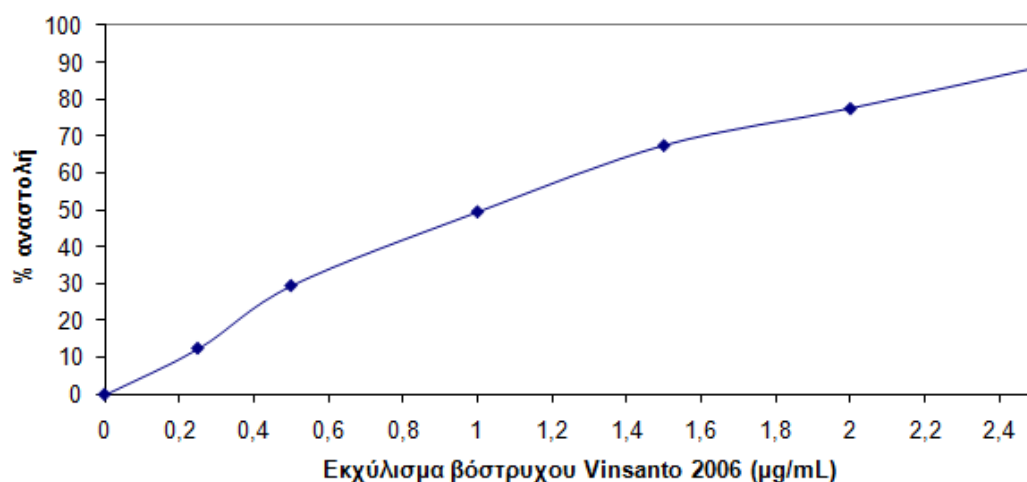
Διάγραμμα 3.4.8 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



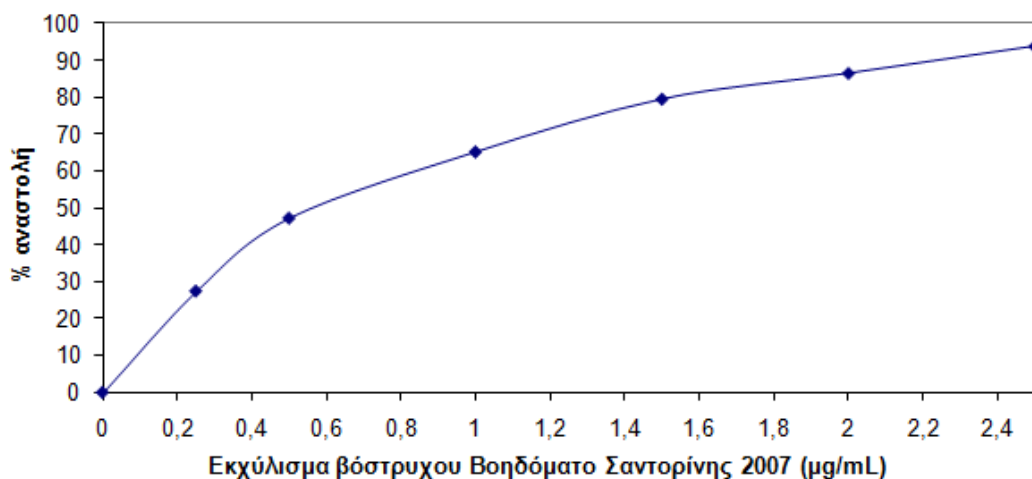
Διάγραμμα 3.4.9 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



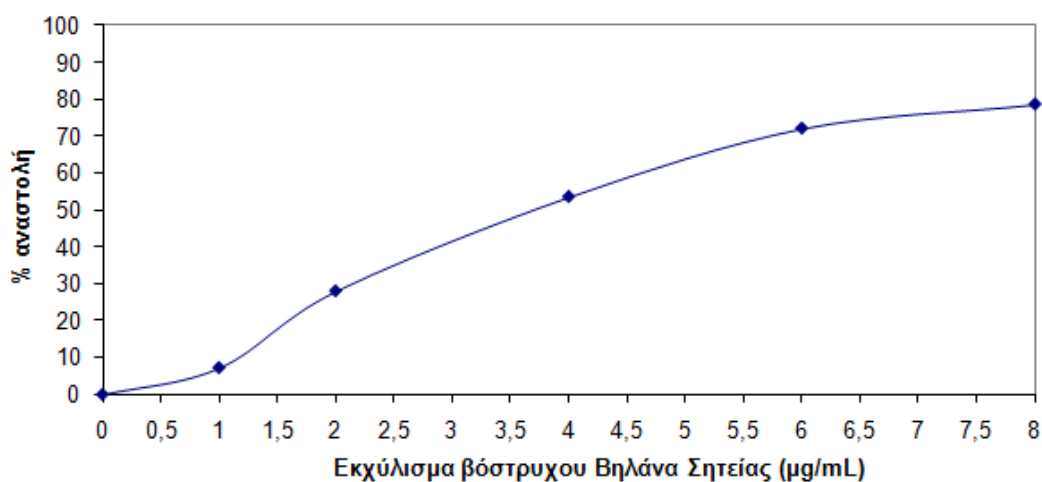
Διάγραμμα 3.4.10 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



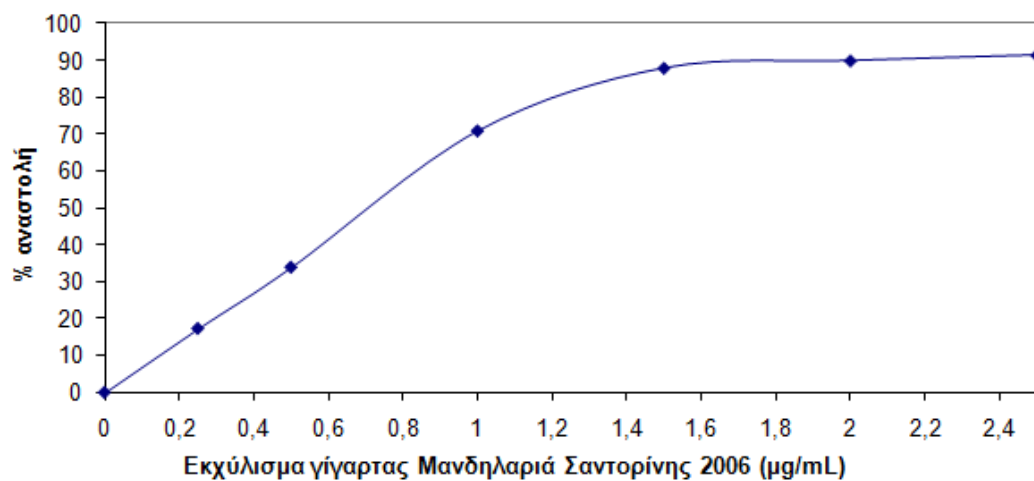
Διάγραμμα 3.4.11 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Vinsanto στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



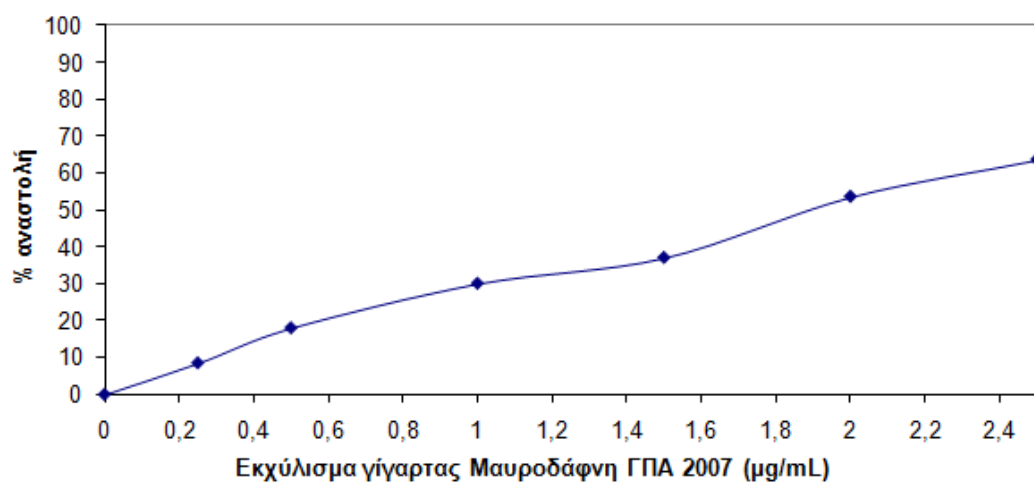
Διάγραμμα 3.4.12 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Βοηδόματο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



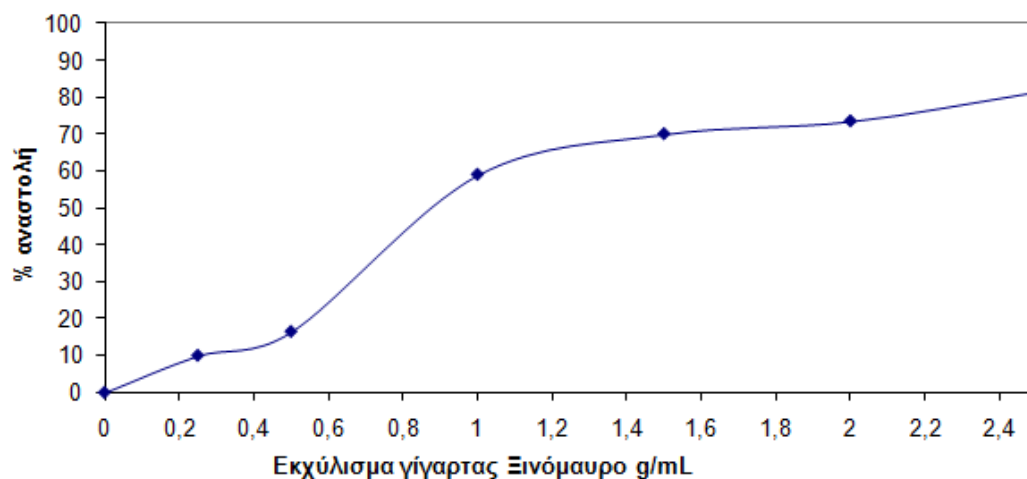
Διάγραμμα 3.4.13 Επίδραση εκχυλίσματος βόστρυχου από την ποικιλία Βηλάνα Σητείας στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



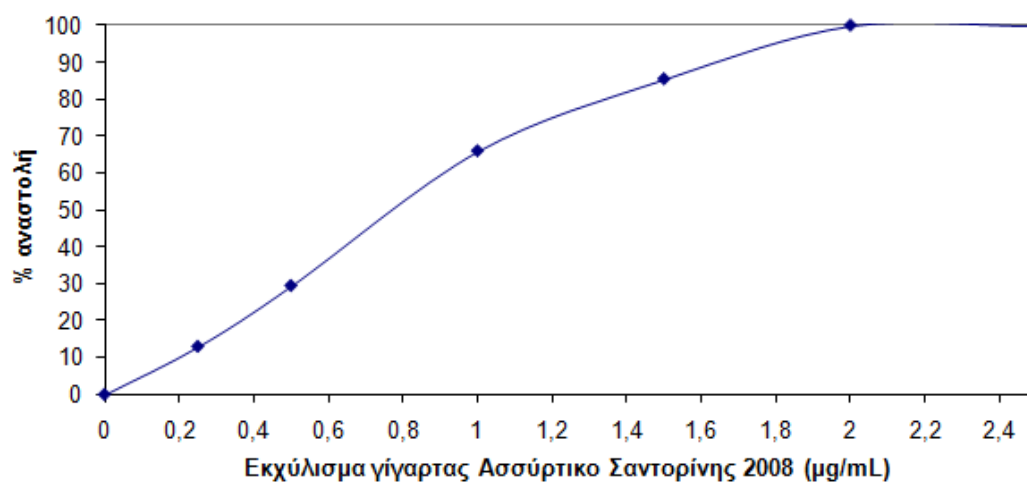
Διάγραμμα 3.4.14 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



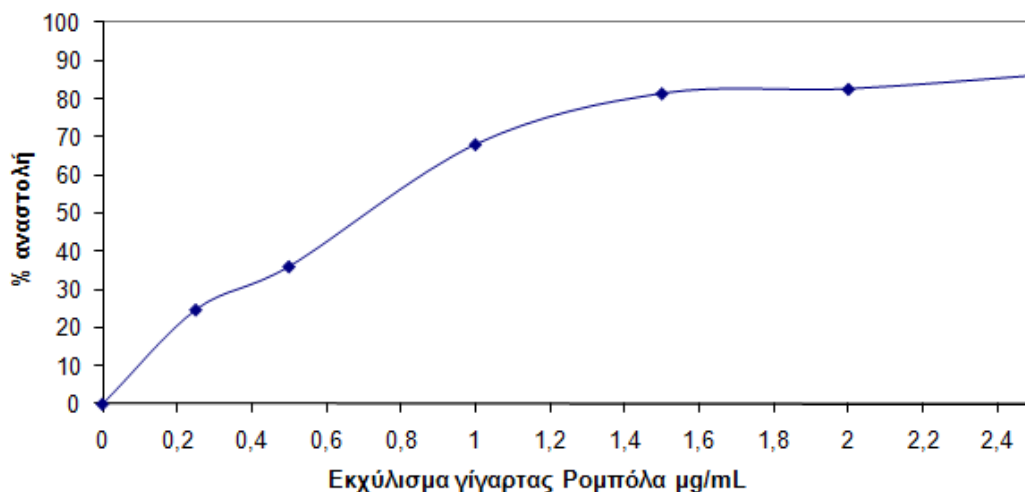
Διάγραμμα 3.4.15 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Μαυροδάφνη ΓΠΑ 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



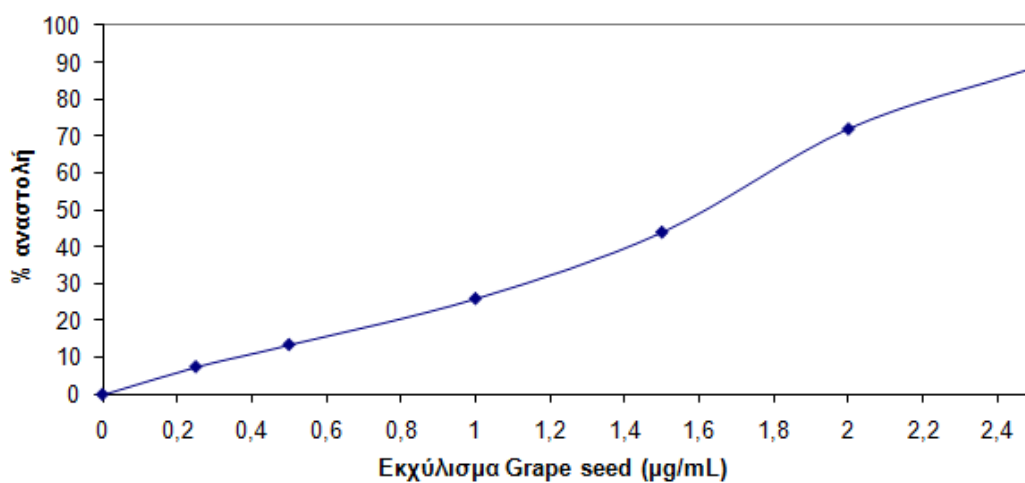
Διάγραμμα 3.4.16 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Ξινόμαυρο στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



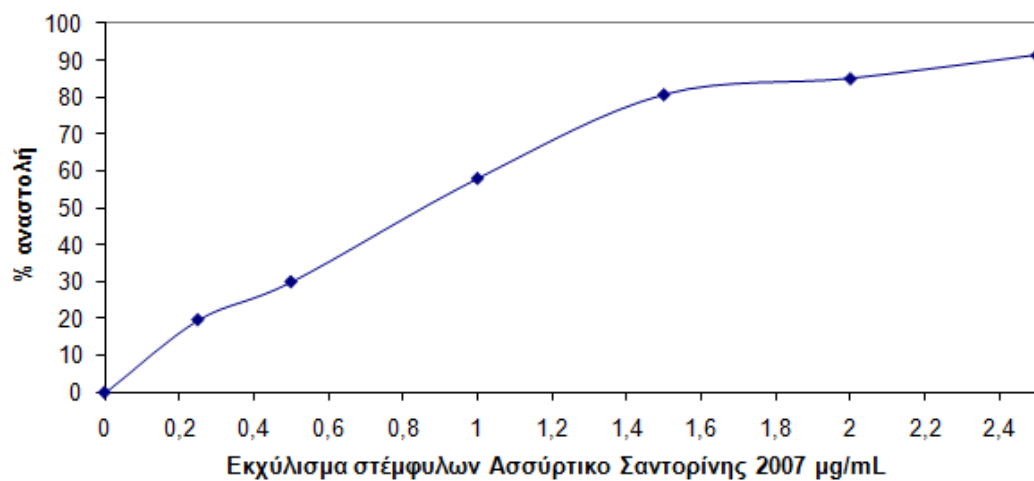
Διάγραμμα 3.4.17 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



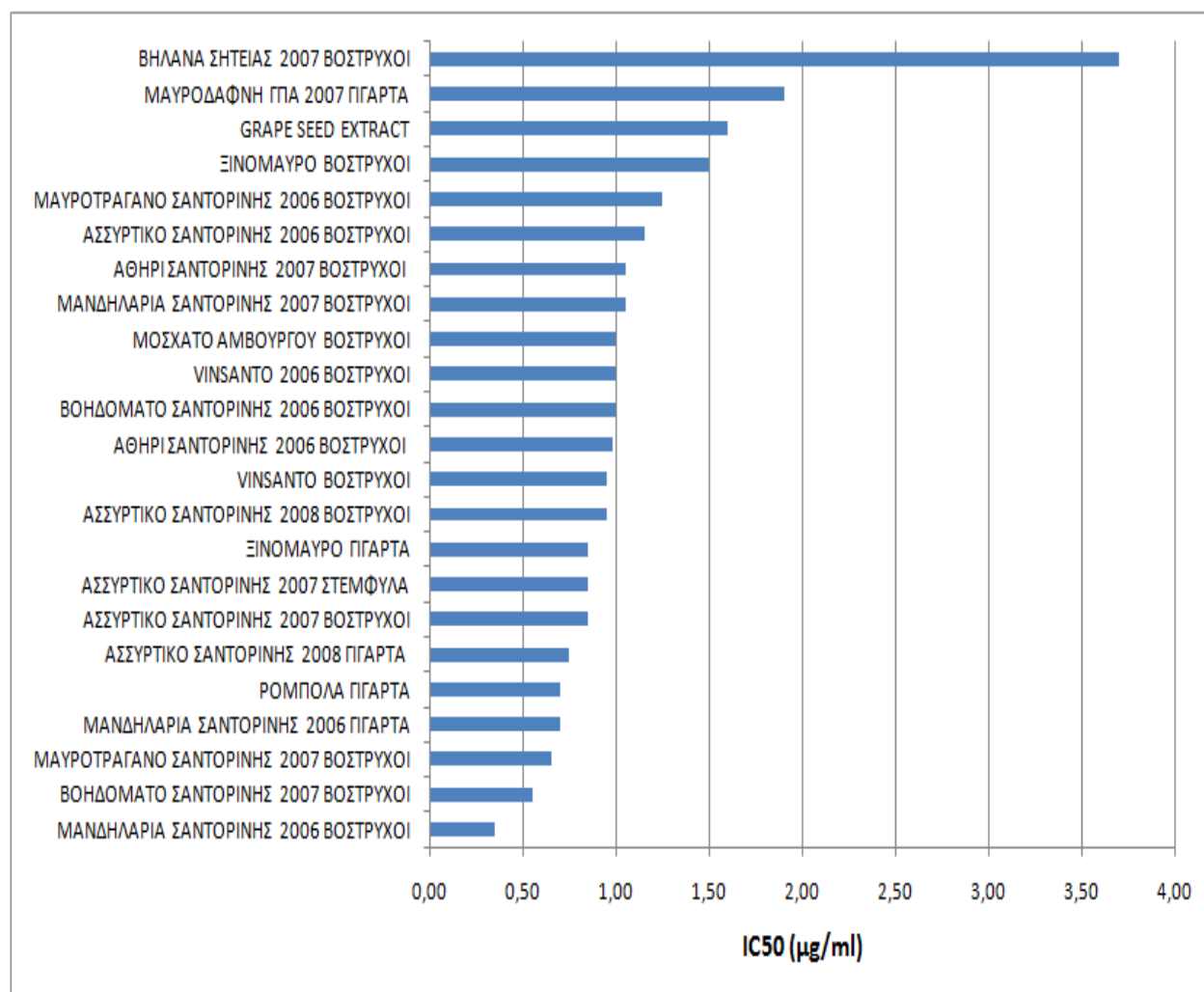
Διάγραμμα 3.4.18 Επίδραση εκχυλίσματος γίγαρτων από την ποικιλία Ρομπόλα στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



Διάγραμμα 3.4.19 Επίδραση εκχυλίσματος Grape seed στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



Διάγραμμα 3.4.20 Επίδραση εκχυλίσματος στέμφυλων από την ποικιλία Ασσύρτικο Σαντορίνης 2007 στις επαγόμενες από τις ρίζες ROOH• ρήξεις σε πλασμιδιακό DNA.



Γράφημα 3.4 Απεικονίζονται οι τιμές IC₅₀ των εκχυλισμάτων από ελληνικές ποικιλίες αμπέλου έναντι των επαγόμενων από ρίζες ROOH• ρήξεων σε πλασμιδιακό DNA. Τα εκχυλίσματα βόστρυχων από τις ποικιλίες Αθήρι Σαντορίνης 2006, Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007 και Αθήρι Σαντορίνης 2007 είχαν εξεταστεί σε άλλη μελέτη (Ακριβούλη 2007).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι μεταλλάξεις που προκαλούνται στο DNA από διάφορους παράγοντες, όπως το οξειδωτικό στρες, θεωρούνται ένα σημαντικό στάδιο κατά την καρκινογένεση, καθώς και σε άλλες εκφυλιστικές διαδικασίες όπως είναι οι καρδιοπάθειες, οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες (π.χ. Αλτσχάιμερ, Πάρκινσον) και η πρόωγη γήρανση (Wiseman και συν., 1995). Τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις χημειοπροστατευτικές ιδιότητες των εκχυλισμάτων αμπέλου (*Vitis vinifera*), ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται κυρίως στα πολυφαινολικά συστατικά που περιέχουν (Meyer et al, 1997; Torres et al, 2002). Το ενδιαφέρον για τις πολυφαινόλες οφείλεται στις σημαντικές αντιοξειδωτικές ιδιότητες τους και στον πιθανό ρόλο τους στην πρόληψη ασθενειών, που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Μέχρι σήμερα όμως στις μελέτες που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική και χημειοπροστατευτική δράση της αμπέλου είχαν χρησιμοποιηθεί εκχυλίσματα από τον καρπό του φυτού και κυρίως από τα γίγαρτα. Είναι χαρακτηριστικό ότι εκχυλίσματα από γίγαρτα με την ονομασία ‘Grape seed extract’ χρησιμοποιούνται διεθνώς ως συμπλήρωμα διατροφής κυρίως λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Ωστόσο, μελέτες έχουν δείξει ότι και εκχυλίσματα από τους βόστρυχους του φυτού είναι πλούσια σε πολυφαινόλες και άρα μπορεί να έχουν βιολογικές ιδιότητες ανάλογες με αυτές των άλλων πολυφαινολικών εκχυλισμάτων του φυτού. Κατά συνέπεια, ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιοξειδωτικής και χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων βοστρύχων ελληνικών ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera*). Μάλιστα, μελετήθηκαν και κάποια εκχυλίσματα από γίγαρτα και στέμφυλα προκειμένου να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Για την μελέτη των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις *in vitro* μέθοδοι, οι οποίες στηρίζονται στην εξουδετέρωση των σταθερών χημικών ριζών DPPH[•] και ABTS^{•+} από αντιοξειδωτικές ενώσεις και στην πιθανή χημειοπροστατευτική δράση των εκχυλισμάτων στην επαγόμενη οξειδωτική βλάβη του DNA από δραστικές μορφές οξυγόνου όπως είναι οι ρίζες OH[•] και ROO[•]. Άλλωστε, η επαγόμενη πρόκληση μονόκλωνων θραυσμάτων από ROS θεωρείται ότι εμπλέκεται σε σοβαρές παθολογικές καταστάσεις όπως οι μεταλλαξιογένεση και η καρκινογένεση (Stagos et al., 2005).

Με βάση τις τιμές των IC₅₀ του γραφήματος 3.1 το σύνολο των 24 εκχυλισμάτων που μελετήθηκαν παρουσίασαν ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας του DPPH[•] και μάλιστα τα περισσότερα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις. Το εύρος των τιμών IC₅₀

κυμαινόταν από 4,2μg/ml έως 15μg/ml. Τα πιο ισχυρά εκχυλίσματα βόστρυχου ήταν του Μαυροτράγανου Σαντορίνης 2006 και του Ασσύρτικού Σαντορίνης 2006 με IC₅₀ 4,2μg/ml, ενώ τα πιο ασθενή ήταν τα εκχυλίσματα που προέκυψαν από βόστρυχους του Vinsanto, του Μαυροτράγανου Σαντορίνης 2008 καθώς και από το Αθήρι Σαντορίνης 2007, με τιμές IC₅₀ μεγαλύτερες από 10-15μg/ml. Ήταν αξιοσημείωτο ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων ήτανε παραπλήσια ή και ισχυρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων από τα γίγαρτα. Ενδεικτικά, τα εκχυλίσματα βόστρυχων από τις ποικιλίες Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006 και 2007, Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2006, Αθήρι Σαντορίνης 2006 και Vinsanto 2006 παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση με τιμή IC₅₀ περίπου 4,5μg/ml, που πρόκειται για τιμή παραπλήσια με αυτής των γιγάρτων (γράφημα 3.1). Ωστόσο, όλα τα εκχυλίσματα από τα γίγαρτα είχαν πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα βόστρυχων που προέρχονταν από τις ίδιες ποικιλίες αμπέλου. Υπήρχαν όμως εκχυλίσματα βόστρυχων που είχαν μικρότερο IC₅₀ σε σύγκριση με εκχυλίσματα γιγάρτων που προέρχονταν από διαφορετικές ποικιλίες (π.χ. σύγκριση ανάμεσα στο εκχύλισμα βόστρυχου Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006 και στο εκχύλισμα γιγάρτων Ρομπόλα). Επίσης, το εκχύλισμα βόστρυχου Ασσύρτικο Σαντορίνης 2007 είχε ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας DPPH σε σύγκριση με το εκχύλισμα στέμφυλων της ίδιας ποικιλίας. Όσον αφορά τη σύγκριση στην αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα στα εκχυλίσματα βόστρυχων από άσπρες και κόκκινες ποικιλίες αμπέλου δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές. Επίσης, η μέθοδος του DPPH έδειξε ότι δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Για παράδειγμα, ήτανε χαρακτηριστικό ότι το εκχύλισμα βόστρυχου (Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006) με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είχε παρόμοια πολυφαινολική συγκέντρωση με το ασθενέστερο εκχύλισμα (Αθήρι Σαντορίνης 2007). Αυτό δείχνει ότι είτε η ποιοτική σύσταση και όχι η ποσοτική σε πολυφαινόλες των εκχυλισμάτων παίζει σημαντικότερο ρόλο στον καθορισμό της αντιοξειδωτικής τους δράσης ή/και υπάρχουν και άλλα συστατικά εκτός από τις πολυφαινόλες στα οποία οφείλεται η αντιοξειδωτική δράση. Επίσης, εκχυλίσματα βόστρυχων της ίδιας ποικιλίας (π.χ. Ασσύρτικο Σαντορίνης, Μανδηλαριά Σαντορίνης) αλλά διαφορετικής χρονιάς είχαν και διαφορετική αντιοξειδωτική δράση, που οφείλεται πιθανώς στο ότι η χημική τους σύσταση δεν είναι ίδια λόγω των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών.

Η εξέταση των εκχυλισμάτων με τη ρίζα ABTS⁺⁺, έδειξε όπως και η μέθοδος με το DPPH ότι έχουν σημαντική ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας. Αντίστοιχα, το εύρος των τιμών IC₅₀ κυμαινόταν από 3μg/ml έως 6,8μg/ml (με εξαίρεση το εκχύλισμα Βηλάνα Σητείας 2007 με IC₅₀ 11,8μg/ml). Δηλαδή, στην περίπτωση αυτή το εύρος των τιμών IC₅₀ ήταν μικρότερο σε σύγκριση με τη μέθοδο DPPH (4,2-15μg/ml). Το εκχύλισμα βόστρυχου με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση ήταν της Μανδηλαριάς Σαντορίνης 2007 με τιμή IC₅₀ 3μg/ml. Η τιμή αυτή ήταν παραπλήσια με τις τιμές IC₅₀ των ισχυρότερων από τα εκχυλίσματα γιγάρτας που μελετήθηκαν. Όπως και στη μέθοδο DPPH, όλα τα εκχυλίσματα από τα γιγάρτα είχαν πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα βόστρυχων που προέρχονταν από τις ίδιες ποικιλίες αμπέλου. Υπήρχαν όμως εκχυλίσματα βόστρυχων που είχαν μικρότερο IC₅₀ σε σύγκριση με εκχυλίσματα γιγάρτων που προέρχονταν από διαφορετικές ποικιλίες (π.χ. σύγκριση ανάμεσα στο εκχύλισμα βόστρυχου Μανδηλαριά Σαντορίνης 2007 και στο εκχύλισμα γιγάρτων Ξινόμαυρο). Επίσης, στη μέθοδο ABTS όπως και σε αυτή με το DPPH, το εκχύλισμα βόστρυχου Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 είχε ισχυρότερη ικανότητα εξουδετέρωσης της ρίζας σε σύγκριση με το εκχύλισμα στέμφυλων της ίδιας ποικιλίας. Επίσης, και η μέθοδος ABTS δεν έδειξε σημαντικές διαφορές όσον αφορά την αντιοξειδωτική δράση ανάμεσα σε άσπρες και κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών. Τα ίδια συμπεράσματα με τη μέθοδο DPPH προέκυψαν και από τη μέθοδο ABTS σχετικά με τη σχέση ανάμεσα στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Για παράδειγμα, το εκχύλισμα βόστρυχου Ασύρτικο Σαντορίνης 2008 έχει τιμή IC₅₀ 3,5μg/ml και πολυφαινολική συγκέντρωση 372mg/g ενώ το εκχύλισμα Αθήρι Σαντορίνης 2006 έχει μεγαλύτερη τιμή IC₅₀ (6,3μg/ml) από το προηγούμενο εκχύλισμα αλλά και μεγαλύτερη πολυφαινολική συγκέντρωση (559μg/g). Επίσης, εκχυλίσματα βόστρυχων της ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής χρονιάς είχαν και διαφορετική αντιοξειδωτική δράση, που οφείλεται πιθανώς στο ότι η χημική τους σύσταση δεν είναι ίδια λόγω των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών. Επίσης, η σειρά αντιοξειδωτικής δράσης των εκχυλισμάτων διαφέρει ανάμεσα στη μέθοδο DPPH και ABTS λόγω πιθανόν της διαφορετικής χημικής δομής των δύο εξεταζόμενων ριζών. Αυτό δείχνει ότι για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση ενός εκχυλίσματος είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούνται δύο ή περισσότερες ελεύθερες ρίζες.

Στη μέθοδο της επίδρασης ριζών OH^\bullet επάνω στο πλασμιδιακό DNA τα εκχυλίσματα από βόστρυχους μπορούσαν να αναστείλουν τις προκαλούμενες από ρίζες OH^\bullet βλάβες στο πλασμιδιακό DNA, με τιμές IC_{50} από 200-800 $\mu\text{g/ml}$ (γράφημα 3.30). Ισχυρότερη δράση είχε το εκχύλισμα βόστρυχου από την ποικιλία Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 και ασθενέστερη από την ποικιλία Ξινόμαυρο. Η προστατευτική δράση των εκχυλισμάτων βόστρυχου έναντι των βλαβών που προκαλούνταν από τις ρίζες OH^\bullet στο DNA ήταν σε ορισμένες περιπτώσεις παραπλήσια ή και ισχυρότερη από αυτή των εκχυλισμάτων γιγάρτων. Γενικά, όλα τα εκχυλίσματα από τα γιγάρτα είχαν πιο ισχυρή αντιμεταλλαξιγόνο δράση από τα αντίστοιχα εκχυλίσματα βόστρυχων που προέρχονταν από τις ίδιες ποικιλίες αμπέλου. Υπήρχαν όμως εκχυλίσματα βόστρυχων που είχαν μικρότερο IC_{50} σε σύγκριση με εκχυλίσματα γιγάρτων που προέρχονταν από διαφορετικές ποικιλίες (π.χ. σύγκριση ανάμεσα στο εκχύλισμα βόστρυχου Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 και στο εκχύλισμα γιγάρτων Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006). Επίσης, το εκχύλισμα βόστρυχου Ασύρτικο Σαντορίνης 2007 είχε παραπλήσια προστατευτική ικανότητα έναντι των βλαβών του DNA σε σύγκριση με το εκχύλισμα στέμφυλων της ίδιας ποικιλίας. Επίσης, δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την αντιμεταλλαξιγόνο δράση ανάμεσα σε εκχυλίσματα από άσπρες και κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών. Επίσης, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην αντιμεταλλαξιγόνο δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινολικό τους περιεχόμενο. Για παράδειγμα, ήτανε χαρακτηριστικό ότι το εκχύλισμα βόστρυχου Βοηδόματο Σαντορίνης 2006 με την ισχυρότερη προστατευτική δράση έναντι των βλαβών του DNA είχε μικρότερη πολυφαινολική συγκέντρωση από το πιο ασθενές εκχύλισμα Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006. Άρα και στην περίπτωση αυτή ισχύουν τα συμπεράσματα που αναφέρθηκαν παραπάνω για τις μεθόδους DPPH και ABTS σχετικά με τη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων και τη χημική τους σύσταση. Επιπλέον, και στην περίπτωση αυτή ισχύει ότι εκχυλίσματα βόστρυχων της ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής χρονιάς είχαν και διαφορετική δραστηριότητα, που οφείλεται πιθανώς στο ότι η χημική τους σύσταση δεν είναι ίδια λόγω των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών. Όσον αφορά τη συσχέτιση ανάμεσα στη σειρά προστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών στο DNA από τις ρίζες OH^\bullet και στη σειρά δραστηριότητας που προέκυψε από τις μεθόδους DPPH και ABTS, η ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson έδειξε ότι υπήρξε συσχέτιση μόνο στην προστασία από τις ρίζες OH^\bullet και στη μέθοδο ABTS ($r = 0.789$, $p < 0.0001$). Αυτό δείχνει ότι η μέθοδος ABTS είναι περισσότερο κατάλληλη για να προβλέψει την προστατευτική δράση

αντιοξειδωτικών ουσιών από βλάβες στο DNA που προκαλούνται από ρίζες OH^\bullet . Η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων βόστρυχου έναντι των βλαβών που προκαλούνταν από ρίζες OH^\bullet στο DNA δείχνει ότι πιθανώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για χημειοπροστασία από παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκινογένεση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες) που οφείλονται σε επαγόμενες από ελεύθερες ρίζες βλάβες στο DNA. Μάλιστα, οι ρίζες αυτές παρήχθησαν με φωτόλυση του H_2O_2 μέσω υπεριώδους ακτινοβολίας. Περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η υπεριώδης και η ιονίζουσα ακτινοβολία, οι διάφοροι μολυσματικοί παράγοντες όπως είναι το κάπνισμα δύναται να προκαλούν τον σχηματισμό των δραστικών μορφών οξυγόνου (Halliwell, 1997), οι οποίες εκτός των άλλων επιπτώσεων έχουν κατηγορηθεί και για τη γήρανση του δέρματος (Ames et al, 1993). Επίσης, η υπεριώδης ακτινοβολία επάγει ένα μεγάλο αριθμό παθολογικών καταστάσεων στο δέρμα με πιο επιβλαβή τον καρκίνο του δέρματος. Η βλάβη του DNA έχει προσδιοριστεί ως εκκινητής του σχηματισμού αυτού του είδους του καρκίνου. Κατά συνέπεια, μια πιθανή εφαρμογή αυτών των εκχυλισμάτων θα ήταν η προσθήκη τους σε δερματολογικές κρέμες για προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία.

Εκτός από τις ρίζες OH^\bullet , τα εκχυλίσματα δοκιμάστηκαν απέναντι και στην πρόκληση βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO^\bullet . Σύμφωνα με τις τιμές IC_{50} , όλα τα εκχυλίσματα επέδειξαν ισχυρή δοσοεξαρτώμενη προστατευτική δράση στην επαγόμενη από ρίζες ROO^\bullet βλάβη στο DNA, με τις τιμές αυτές να κυμαίνονται από 0,35μg/ml έως 1,5μg/ml (εκτός του εκχυλίσματος Βηλάνα Σητείας 2007 με IC_{50} 3,7). Ήταν αξιοσημείωτο, ότι τρία εκχυλίσματα βόστρυχων, Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006, Βοηδόματο Σαντορίνης 2007 και Μαυροτράγανο Σαντορίνης 2007, είχαν την ισχυρότερη προστατευτική δράση από όλα τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα. Δηλαδή, στην εξέταση της προστασίας των εκχυλισμάτων από τις ρίζες ROO^\bullet , σε αντίθεση με τις άλλες τρεις μεθόδους, υπήρξε εκχύλισμα βόστρυχου (Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006) που επέδειξε πιο ισχυρή προστατευτική δράση σε σύγκριση με το αντίστοιχο εκχύλισμα γιγάρτων που προέρχονταν από την ίδια ποικιλία αμπέλου. Βέβαια, όπως παρατηρήθηκε και στις άλλες μεθόδους, και σε αυτή την περίπτωση εκχυλίσματα βόστρυχων είχαν μικρότερο IC_{50} σε σύγκριση με εκχυλίσματα γιγάρτων που προέρχονταν από διαφορετικές ποικιλίες. Επίσης, το εκχύλισμα βόστρυχου Ασσύρτικο Σαντορίνης 2007 είχε παραπλήσια προστατευτική ικανότητα έναντι των βλαβών του DNA από τις ρίζες ROO^\bullet σε σύγκριση με το εκχύλισμα στέμφυλων της ίδιας ποικιλίας, όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και με τις ρίζες OH^\bullet . Όσον αφορά τη συσχέτιση ανάμεσα στη σειρά προστατευτικής δράσης των

εκχυλισμάτων έναντι των βλαβών στο DNA από τις ρίζες ROO[•] και στη σειρά δραστηριότητας που προέκυψε από τις μεθόδους DPPH και ABTS και στην προστασία από τις ρίζες OH[•], η ανάλυση συσχέτισης κατά Pearson έδειξε ότι υπήρξε συσχέτιση στην προστασία από τις ρίζες ROO[•] και στη μέθοδο ABTS ($r = 0.784, p < 0.0001$) καθώς και με την προστασία από τις ρίζες OH[•] ($r = 0.821, p < 0.0001$). Αυτό δείχνει ότι η μέθοδος ABTS είναι περισσότερο κατάλληλη για να προβλέψει την προστατευτική δράση αντιοξειδωτικών ουσιών από βλάβες στο DNA που προκαλούνται από ρίζες ROO[•], δηλαδή όπως ακριβώς παρατηρήθηκε και με τις βλάβες στο DNA από τις ρίζες OH[•]. Επιπλέον, το γεγονός ότι υπήρξε συσχέτιση ανάμεσα στις σειρές δραστηριότητας των εκχυλισμάτων που προέκυψαν από την προστασία έναντι των ριζών ROO[•] και OH[•] δείχνει ότι τα ίδια συστατικά των εκχυλισμάτων μπορούν και προστατεύουν το DNA ανεξάρτητα από το είδος της ελεύθερης ρίζας που προκαλεί τη βλάβη. Το γεγονός ότι οι τιμές IC₅₀ έναντι των ριζών ROO[•] ήταν πολύ μικρότερες σε σύγκριση από αυτές έναντι των ριζών OH[•], μπορεί να εξηγηθεί από το ότι οι ρίζες OH[•] έχουν πολύ μεγάλη ταχύτητα αντίδρασης με το DNA και άρα χρειάζονται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μιας αντιοξειδωτικής ουσίας για να παρεμποδίσει τη δράση τους. Επίσης, τα αποτελέσματα και αυτής της μεθόδου έδειξαν ότι δεν υπήρχε συσχέτιση ανάμεσα στην αντιμεταλλαξιγόνο δράση των εκχυλισμάτων και το συνολικό πολυφαινόλικό τους περιεχόμενο. Ωστόσο, τα 2 πιο ισχυρά εκχυλίσματα (Μανδηλαριά Σαντορίνης 2006 και Βοηδόματο Σαντορίνης 2007) είχαν αυξημένη συγκεντρώσεις γαλλικού οξέος, trans-ρεσβερατρόλης, ε-βινιφερίνης και καμπερόλης σε σύγκριση με τα 2 πιο ασθενή εκχυλίσματα (Ασσύρτικο Σαντορίνης 2006 και Αθήρι Σαντορίνης 2007), και άρα και αυτές οι πολυφαινόλες ίσως να ευθύνονται για την προστασία από τις ρίζες ROO[•]. Επίσης, και σε αυτή τη μέθοδο δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την αντιμεταλλαξιγόνο δράση ανάμεσα σε εκχυλίσματα από άσπρες και κόκκινες ποικιλίες σταφυλιών. Επιπλέον, και στην περίπτωση αυτή ισχύει ότι εκχυλίσματα βόστρυχων της ίδιας ποικιλίας αλλά διαφορετικής χρονιάς είχαν και διαφορετική δραστηριότητα, που οφείλεται πιθανώς στο ότι η χημική τους σύσταση δεν είναι ίδια λόγω των διαφορετικών κλιματολογικών συνθηκών. Γενικά, η ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων βόστρυχου έναντι των βλαβών που προκαλούνταν από ρίζες ROOH[•] στο DNA δείχνει ότι πιθανώς θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για χημειοπροστασία από παθολογικές καταστάσεις (π.χ. καρκινογένεση, νευροεκφυλιστικές ασθένειες) που οφείλονται σε επαγόμενες από ελεύθερες ρίζες βλάβες στο DNA.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα από βόστρυχους αμπέλου έχουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση που είναι συγκρινόμενη με αυτή των εκχυλισμάτων από τα γίγαρτα. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την προστατευτική τους δράση έναντι των βλαβών στο DNA που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες. Είναι χαρακτηριστικό ότι σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας για τη πενταετία 1996 – 2000 η παραγωγή σταφυλιών προς οινοποίηση στην Ελλάδα ήταν κατά μέσο όρο 524.780 τόνοι (η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών θεωρείται μια από τις μεγαλύτερες καλλιέργειες και το 2006 άγγιξε τα 69 εκατομμύρια τόνους, στοιχεία FAOSTAT, 2007). Αν λάβουμε υπόψη ότι από 100 kg σταφύλια προς οινοποίηση τα νωπά στέμφυλα είναι περίπου το 27%, στην Ελλάδα στην πενταετία 96-2000 παρήχθησαν περίπου 142.000 τόνοι στέμφυλα. Τα στέμφυλα περιλαμβάνουν τη νωπή πούλπα, τα γίγαρτα, και τους βόστρυχους και αποτελούν τα υποπροϊόντα των οινοποιείων. Υπολογίζεται πως από 10 kg νωπά στέμφυλα παραλαμβάνονται 3 kg νωπή πούλπα, 2,5 kg νωπά γίγαρτα και 2 kg βόστρυχοι. Το υπόλοιπο αντιπροσωπεύει απώλειες κυρίως από υγρή μορφή. Συνεπώς, από τους 142.000 τόνους νωπά στέμφυλα προκύπτουν 28.000 τόνοι βόστρυχων. Αυτά τα υποπροϊόντα δεν αξιοποιούνται βιομηχανικά, παρά μόνο σε πολύ μικρό ποσοστό για ζωοτροφές. Μάλιστα, σε ορισμένες περιπτώσεις η απόρριψή τους δημιουργεί περιβαλλοντολογικά προβλήματα. Συνεπώς, εκχυλίσματα βόστρυχων θα μπορούσαν πιθανώς να χρησιμοποιηθούν για την παρασκευή αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής, για την ανάπτυξη βιολειτουργικών τροφίμων με αντιοξειδωτική δράση, σε φαρμακευτικά ή καλλυντικά προϊόντα όπως γίνεται με τα εκχυλίσματα από τα γίγαρτα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal C., Sharma Y. and Agarwal R., (2000), Anticarcinogenic effect of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in human prostate carcinoma DU145 cells: modulation of mitogenic signalling and cell-cycle regulators and induction of G1 arrest and apoptosis, Mol. Carcinogen. 28: 129–138.
- Alacron De Lastra C, Martin MJ, Motilva V. Pharmacology. 1994 48:56-52

- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM., (1993), Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90:7915–22
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA, Joshi SS, Pruess HG. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000 148:187-197.
- Bagchi D, Ray SD, Bagchi M, Preuss HG, Stohs SJ. Mechanistic pathways of antioxidant cytoprotection by a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Indian J Exp Biol*. 2002 40:717-726.
- Bell JR, Donovan JL, Wong R, Waterhouse AL, German JB, Walzem RL, Kasim-Karakas
- SE. (+)-Catechin in human plasma after ingestion of a single serving of reconstituted red wine. *Am J Clin Nutr*. 2000 71:103–108.
- Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res*. 1998 24:133–138.
- Bishop DJM, Weinberg RA, “*The themes hallmarks in of Cancer*”, Cell, 00:57-70, 2000.
- Boffetta P, Garfinkel L. Alcohol drinking and mortality among men enrolled in an American Cancer Society prospective study. *Epidemiology*. 1990 1:342-348.
- Boulton DW, Walle UK, Walle T. Extensive binding of the bioflavonoid quercetin to human plasma proteins. *J Pharm Pharmacol*. 1998 50:243–249.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C, “*Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*”, Food Science and Technology, 28, 25–30, 1995.
- Breinhold V, Lauridson ST, Dragsted LO. Differential effects of dietary flavonoids on drug metabolising and antioxidant enzymes in female rat. *Xenobiotica*. 1999 29:1227-1240.
- Cammac R, “*Electron spin response*”, The biochemistry of plants, Vol 13, 229-57, 1987.

- Cao G, Muccitelli HU, Sanchez-Moreno C, Prior RL. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. *Am J Clin Nutr*. 2001 73:920-926.
- Caragay AB, "Cancer- preventative foods and ingredients" *Food Tech* 46(4), 65-68: 1992.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2000 130:1963–1970.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*. 1993 13:2165-2170
- Cheeseman KH, Slater TF, "An introduction to free radical biochemistry" : Ends free radicals in medicine, *British Medical bulletin*, vol 49, 481-93, 1993.
- Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, Newbold RR, Doerge DR. Mass spectrometric determination of Genistein tissue distribution in diet-exposed Sprague-Dawley rats. *J Nutr*. 2000 130:1963–1970.
- Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*. 1993 13:2165-2170
- Chou EJ, Keevil JG, Aeschlimann S, Wiebe DA, Folts JD, Stein JH. *Am J Cardiol*. Effect of ingestion of purple grape juice on endothelial function in patients with coronary heart disease. 2001 5:553-555.
- Chu SC, Hsieh YS, Lin JY. Inhibitory effects of flavonoids on Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase activity. *J Nat Prod*. 1992 55:179–183.
- Coldham NG, Sauer MJ. Pharmacokinetics of [(14)C]Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implications for human health. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 164:206–215.
- Colic M, Pavelic K. Molecular mechanisms of anticancer activity of natural dietetic products. *J Mol Med*. 2000 78:333-336.
- Crespy V, Morand C, Manach C, Besson C, Demigne C, Remesy C. Part of quercetin absorbed in the small intestine is conjugated and further secreted in the intestinal lumen. *Am J Physiol*. 1999 277:120–126.
- Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu XO, Hebert JR, Custer LJ, Cheng J, Gao YT, Zheng W. Urinary excretion of phytoestrogens and risk of breast cancer among Chinese women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002 11:815-821.

- Dangles O, Dufour C, Bret S. Flavonol–serum albumin complexation. Two-electron oxidation of flavonols and their complexes with serum albumin. *J Chem Soc.* 1999 2:737–744.
- Day AP, Kemp HJ, Bolton C, Hartog M, Stansbie D. Effect of concentrated red grape juice consumption on serum antioxidant capacity and low-density lipoprotein oxidation. *Ann Nutr Metab.* 1997 41: 353-357.
- Della Loggia R, Tubaro A, Ori P, Zilli C, Del Negro P. Plant Flavonoids in Biology and Medicine. *Progress in Clinical and Biological Research.* 1986 213:481–489.
- Deprez S, Mila I, Huneau J-F, Tomé D, Scalbert A. Transport of proanthocyanidin dimer, trimer and polymer across monolayers of human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Antioxid Redox Signal.* 2001 3:957–967.
- Di Carlo G., Mascolo N., Izzo A., Capasso F, (1999), Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs, *Life Sciences*, 4:337-353
- Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk L, “*Lipid peroxidation cannot be used as universal criterion of oxidative stress*”, *Progr Lipid Res*, 43: 200-227, 2004.
- Duthie G, “*Determination of activity of antioxidants in human subjects*”, *Proceedings of the Nutrition Society* 58: 1015-1024, 1999.
- Eaton-Evans J.Br *J Biomed Sci.* 1994 51:358-370
- Elliot RH, Strunin L, “*Hepatotoxicity of volatile anaesthetics*”, *British Journal of Anaesthesia*, 70: 339–349, 1993.
- Evans PH, “*Free radicals in brain metabolism and pathology*”, *British Medical Bulletin*, 49: 577–587, 1993.
- FAO Statistical Database, 2007 FAOSTAT (2007).FAO Statistical Database, <<http://www.fao.org>>
- Ferguson Lynnette R, (2001), Role of plant polyphenols in genomic stability, *Mutation Research*, 475:89-111
- Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA. Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis.* 1998 19:2151–2158
- Fukumoto LR, Mazza G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J Agric Food Chem.* 2000 48:3597-3604.

- Garcia-Closas R, Gonzalez CA, Agudo A, Riboli E. Intake of specific carotenoids and flavonoids and the risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control*. 1999 10:71-75.
- Gilbert D.L, “*Fifty years of radical ideas*”, Ann NY Acad Sci, 899:1, 2000
- Graefe EU, Wittig J, Mueller S, et al. Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol*. 2001 41:492–499.
- Gutteridge J. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 1995, 41/12,1819-1828.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect*. 1994 102:5-12.
- Halliwell B., (1997), Antioxidants and human disease: a general introduction. *Nutr Rev* 55:S44–9
- Halliwell B., (2001), Free Radicals and other reactive oxygen species in Disease, *Encyclopedia of Life Science*
- Halliwell B and Gutteridge JMC, “*Role of free radicals and catalytic metalions in human disease: an overview*”, in Parker L, Glazer AN , *Methods in Enzyme bgy* 186, 1990.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “*Free Radicals in Biology and Medicine*”, 11: 416-493, 188-266, 1989.
- Halliwell B, Gutteridge JMC, “*The antioxidants of human extracellular fluids*”, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1–8, 1990.
- Harborne JB. Nature, distribution and function of plant flavonoids. In: *Plant flavonoids in biology and medicine*. Cody B, Middleton E, Harborne JB, eds. Alan Liss: New York, 1986.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J., (2002), Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *The journal of Nutritional Biochemistry*, 13:572-584
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993 342:1007-1011.
- Hollman PC, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*. 1997 51:305–310.

- Hollman PCH, Devries JHM, Vanleeuwen SD, Mengelers MJB, Katan MB. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1995 62:1276–1282.
- Hong SJ, Kim SI, Kwon SM, Lee JR, Chung BC. Comparative study of concentration of isoflavones and lignans in plasma and prostatic tissues of normal control and benign prostatic hyperplasia. *Yonsei Med J.* 2002 43:236–241.
- Hong WK, Sporn MB. Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science.* 1997 278:1073-1077.
- Huang MT, Ferraro T, Ho CT. Cancer chemoprevention by phytochemicals in fruits and vegetables. In: Food Phytochemicals for Cancer Prevention I. Huang MT, Osawa T, Ho CT, Rosen RT eds. American Chemical Society: Washington, DC, 1994.
- Jackson RS. Chemical constituents of grapes and wine. In Wine Science: Principles and applications. Taylor SL ed. Academic Press: San Diego, 1993.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, Bickford PC. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci.* 1999 19:8114-21.
- Keevil JG, Osman HE, Reed JD, Folts JD. Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *J Nutr.* 2000 130:53-56.
- Kerbel RS, Frost P, Liteplo R, Carlow DA, Elliott BE. Possible epigenetic mechanisms of tumor progression: induction of high-frequency heritable but phenotypically unstable changes in the tumorigenic and metastatic properties of tumor cell populations by 5-azacytidine treatment. *J Cell Physiol Suppl.* 1984 3:87-97.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *BMJ.* 1996 312:478-481.
- Knekt P, Kumpulainen J, Jarvinen R, Rissanen H, Heliovaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr.* 2002 76: 560-568.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet.* 1976 24:117–191.

- Le Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intake of flavonoids and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000 92:154-160.
- Lee M-J, Wang Z-Y, Li H, et al. Analysis of plasma and urinary tea polyphenols in human subjects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995 4:393–399.
- Li Y, Trush MA. Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 1994 54:1895s-1898s.
- Liu RH. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations
of phytochemicals. *Am J Clin Nutr.* 2003 78:517S-520S.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B, “An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer’s Disease”, *J Neurochem*, 68 (5), 2061-69, 1977.
- Manach Claudine, Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L., (2004), Polyphenols: food sources and bioavailability, *American Society for Clinical Nutrition*, 79:727-47
- Maubach J, Bracke ME, Heyerick A, et al. Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2003 784:137–144.
- Nepka C, Asproдини E, Kouretas D. Tannins, xenobiotic metabolism and cancer chemoprevention in experimental animals. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1999 24: 183-189.
- Nijveldt R.J., van Nood Els, van Hoorn D.EC., Boelens P. G, van Norren K., van Leeuwen P.AM, (2001), Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential gynaecologic, *American Society for Clinical Nutrition*, 74:48-25
- Parke AL, Ioannides C, Lewis DFV, Parke DV, “Molecular pathology of drugs – disease interaction in chronic autoimmune inflammatory diseases”, *flammopharmacology*, 1: 3–36: 1991.
- Passamonti S, Vrhovsek U, Mattivi F. The interaction of anthocyanins with bilitranslocase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 296:631–636

- Prior R, Xianli W, Schaich K, “*Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements*”, J Agric Food Chem, , 53 (6) : 1841-1856, 2005
- Radtke J, Linseisen J, Wolfram G. Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food composition survey. *Z Ernahrungswiss.* 1998 37:190–197.
- Rahman A, Shahabuddin, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis.* 1989 10:1833-1839.
- Rein D, Lotito S, Holt RR, Keen CL, Schmitz HH, Fraga CG. Epicatechin in human plasma: in vivo determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *J Nutr.* 2000 130:2109S–2114S.
- Renaud S. and Lorgeuil M., (1992), Wine alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet* 339:1523–1526
- Rise-Evans C. A., Miller N. J., Paganga G., (1996), Structure-Antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 No.7 :933-956
- Robak J, Shridi F, Wolbis M, Krolikowska M. Screening of the influence of flavonoids on lipoxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation. *Pol J Pharmacol Pharm.* 1988 40:451-458.
- Saito M, Hosoyama H, Ariga T, Kataoka S, Yamaji N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. *J Agri Food Chem.* 1998 46:1460-1464.
- Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology.* 2002 177:67-80.
- Santos-Buelga C, Scalbert A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J Sci Food Agric.* 2000 80:1094–117.
- Scalbert A. and Williamson G., (2000), Dietary Intake and Bioavailability of polyphenols, *J.Nutrition*, 130:20735-855

- Scheline RR. CRC Handbook of mammalian metabolism of plant compounds. CRC Press: Boca Raton, FL, 1991.
- Singal PK, Khaper N, Palace V, Kumar D, “*The role of oxidative stress in the genesis of heart disease*”, CardioVasc Res, 40: 426-432, 1998.
- Singh RP, Tyagi AK, Dhanalakshmi S, Agarwal R, Agarwal C. Grape seed extract inhibits advanced human prostate tumor growth and angiogenesis and upregulates insulin-like growth factor binding protein-3. *Int J Cancer*. 2004 108:733-740.
- Soares De Moura R, Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmao Correia ML. Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera grape skin extract. *J Pharm Pharmacol*. 2002 11:1515-1520.
- Soleas G. J., Diamandidis E.R., Goldberg D.M., (1997), Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11:287-313
- Sporn MB. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. *Cancer Res*. 1976 36:2699-2702.
- Stagos D, Karaberis E and Kouretas D, (2005), Assesment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a compination of moleculal methods, *In Vivo*: 741-747
- Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997 37:771-785.
- Torres J.L., Varela B., Garcia M.T., Carilla J., Matito C., Centelles J.J., Cascante M., Sort X. and Bobet R., (2002), Valorization of grape (*Vitis vinifera*) byproducts. Antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content, *J. Agric. Food Chem*. 50: 7548–7555
-
- Trosko JE, Chang CC. Stem cell theory of carcinogenesis. *Toxicol Lett*. 1989 49:283-295.

- Toyokuni S, “*Oxidative stress and cancer: the role of redox regulation*”, Biotherapy, 11: 147-154, 1998.
- Trosko JE, Chang CC, Medcalf A. Mechanisms of tumor promotion: potential role of intercellular communication. *Cancer Invest.* 1983 6:511-526
- Valavanidis A, “*Free radicals in organic chemistry*”, University of Athens, 2006.
- Wang G, Umstead TM, Phelps DS, Al-Mondhiry H, Floros J. The effect of ozone exposure on the ability of human surfactant protein A variants to stimulate cytokine production. *Environ Health Perspect.* 2002 110:79-84.
- Wattenberg L W, “*Chemoprevention of cancer*”, Cancer Res, 45: 1-8, 1985.
- Webb A., McCullough M, (2005), Dietary lignans: Potential role in cancer prevention, Nutrition and Cancer, 51:117-131
- Weisse ME, Eberly B, Person DA. Wine as a digestive aid: comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. *BMJ.* 1995 311:1657-1660.
- Willett WC. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. *Science.* 2002 296:695-698.
- Wilson RL, “*Free radical and tissue damage: Mechanistic evidence from radiation studies. In biochemical mechanism of liver injuries*”, New York Academic Press: 123-224, 1978.
- Wiseman H., Kaur H. and Halliwell B., (1995), DNA damage and cancer: measurement and mechanism, Cancer Lett. 93:113–120
- www.wikipedia.com
- Yamamoto T, Hsu S, Lewis J, Wataha J, Dickinson D, Singh B, Bollag WB, Lockwood P, Ueta E, Osaki T, Schuster G. Green tea polyphenol causes differential oxidative environments in tumor versus normal epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 307:230-236.
- Ye X, Krohn R.L., Liu W., Joshi S.S., Kuszynski C.A., McGinn T.R., Bagchi M, Preuss H.G., Stohs S.J. and Bagchi D., (1999),The cytotoxic effects of a

novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells, *Mol. Cell. Biochem.* 196: 99–108

- Yoshino M, Haneda M, Naruse M, Murakami K. Prooxidant activity of flavonoids: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. *Mol Genet Metab.* 1999 68:468-472.
- Yu R, Jiao JJ, Duh JL, Gudehithlu K, Tan TH, Kong AN. Activation of mitogen-activated protein kinases by green tea polyphenols: potential signaling pathways in the regulation of antioxidant-responsive element-mediated phase II enzyme gene expression. *Carcinogenesis.* 1997 18:451–456.
- Καράταγλης Σ., (1994), Φυσιολογία Φυτών, Εκδόσεις Art of text
- Κουρέτας Δημήτριος Βιοχημική Τοξικολογία. Εκδόσεις Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας Λάρισα 2003.
- Σουφλερός Ε. (2000), Οινολογία, τόμος Ι, Εκδόσεις Παπαγεωργίου

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.1 Πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων.

	STEMS (mg/g extract)	Gallic acid	(+)-Catechin	(-)-Epicatechin	Procyanidin B3	Procyanidin B2	Epicatechin gallate	trans-Caffeic acid	trans-Keweenaw	e-Veratrin	α-O-3-galactoside	α-O-3-O-β-lucoside	α-O-3-O- rhamnoside	Quercetin	Kampferol	Caffeic acid	Syringic acid	p-Coumaric acid	Ferulic acid	TPC*
											Κόκκινες ποικιλίες									
B3	Mandilaria Santorini 2006	31,44	65,39	4,34	26,01	5,15	3,14	4,87	12,62	20,15	8,20	2,06	0,34	1,40	0,32	0,34	0,46	0,04	0,04	584
B12	Mandilaria Santorini sun dried 2007	12,84	85,81	0,43	31,55	0,00	7,78	1,62	17,56	31,42	6,63	4,61	0,46	0,60	0,20	ND**	0,07	0,08	0,03	537
B7	Mayrotragano Santorini 2007	8,33	66,28	5,21	21,04	3,36	2,68	2,33	4,85	15,82	11,04	5,84	0,63	0,96	0,17	0,05	0,01	0,07	0,00	584
B15	Mayrotragano Santorini 2008	6,46	100,96	5,59	19,41	4,13	8,53	11,89	12,14	24,53	14,30	5,87	0,79	0,58	0,12	0,05	0,03	0,12	0,00	464
B2	Voidomato Santorini 2006	11,49	46,74	11,14	20,54	0,00	5,61	16,11	5,47	12,79	12,06	3,86	0,90	0,80	0,00	0,51	0,14	0,12	0,00	494
B6	Voidomato Santorini 2007	32,96	84,28	0,00	16,36	0,00	7,68	6,38	20,56	49,08	14,95	7,27	2,82	2,32	0,28	0,06	ND	0,08	0,00	367
											Λευκές ποικιλίες									
B5	Asyrtiko Santorini 2006	22,65	75,87	1,27	31,59	2,52	4,12	4,84	6,10	15,54	13,47	4,53	0,32	2,16	0,09	0,00	0,13	0,08	0,00	451
B10	Asyrtiko Santorini 2007	1,78	68,85	0,00	30,02	2,48	3,25	2,15	5,13	8,54	9,09	5,15	0,71	0,19	ND	0,01	ND	0,04	0,00	574
B8	Asyrtiko Santorini 2008	2,27	98,29	0,00	25,79	8,55	4,46	12,25	11,42	14,53	19,22	7,16	1,53	0,32	0,04	0,00	ND	0,01	0,00	372
B11	Athiri Santorini 2006	8,90	36,49	2,69	20,01	2,55	4,02	0,40	3,86	8,73	4,55	3,01	0,90	0,49	0,03	0,07	0,18	0,04	0,06	559
B14	Athiri Santorini 2007	7,25	51,05	4,02	14,90	2,49	2,37	9,39	8,59	12,07	13,63	4,95	1,34	0,50	0,07	0,01	ND	0,01	0,00	464
B9	Vilana Sitia 2006	14,67	46,46	0,00	19,45	6,66	6,51	0,61	11,60	50,10	17,12	6,15	1,91	0,93	0,17	0,05	0,05	0,07	0,00	454
B13	Asyrtiko Santorini (Stemfylla)	22,21	47,40	12,50	5,22	21,32	12,21	0,44	0,29	1,41	4,25	4,63	1,90	3,52	0,54	0,23	0,25	0,26	0,09	167,0
	a Quercetin																			
	* mg GAE /Kg dm																			
	** Not Detected																			